

**Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie  
Humboldt-Universität zu Berlin,  
Charité, Campus Virchow-Klinikum  
(Direktor: Prof. Dr. med. D. Huhn)**

**PATHOPHYSIOLOGIE UND THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG  
VON HÄMOSTASESTÖRUNGEN BEI DER ORTHOTOPEN  
LEBERTRANSPLANTATION**

**HABILITATIONSSCHRIFT  
zur Erlangung der Venia Legendi**

**für das Fach experimentelle Hämostaseologie**

**vorgelegt von**

**Dr. med. Gabriele Himmelreich**

**Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek**  
**Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen**

**Tag der letzten Prüfung: 3. April 2001**

**Gutachter:**  
**1. Prof. Dr. A. Eucke**  
**2. Frau Prof. Dr. U. Frick**

Die Untersuchungen am Gaubius Institut, Leiden, Niederlande, wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, durchgeführt

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AP(P)	angesäuertes (gepooltes) Plasma
AT III	Antithrombin III
AuC	area under the curve
BIA	Bioimmunoassay
CTAD	Natriumzitat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol
DDAVP	Desamino-8-D-arginin-vasopressin
DEF	Dextransulfat-stimulierte Euglobulinfraktion
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
DS	Dextransulfat
DSP	Dextransulfat-stimuliertes und nicht angesäuertes Plasma
DSAP	angesäuertes und mit DS stimuliertes Plasma
DSAPP	angesäuertes und mit DS stimuliertes gepooltes Plasma
EACA	Epsilonaminocapronsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EMSALT Studie	european multicenter study on the use of aprotinin in liver transplantation
EPI Komplexe	Elastase- $\alpha_1$ -Proteaseninhibitor Komplexe
F	Faktor
Fa	aktivierter Faktor
FFP	frisch gefrorenes Plasma
HMW Kininogen	high molecular weight kininogen
H <sub>2</sub> OAP	angesäuertes und mit destilliertem Wasser versetztes Plasma
H <sub>2</sub> OAPP	angesäuertes und mit destilliertem Wasser versetztes gepooltes Plasma
KIU	kallikrein inhibitor units
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
i-PA	intrinsischer Plasminogenaktivator
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
MA	Maximalamplitude im Thrombelastogramm oder bei der Thrombozytenaggregationsmessung
MA+45/MA	Quotient aus der Amplitude im TEG 45 Minuten nach der MA und der MA
OLT	orthotope Lebertransplantation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PAP Komplexe	Plasminogen- $\alpha_2$ -Antiplasmin Komplexe
PRP	plättchenreiches Plasma mit definierter Thrombozytenzahl
R	Korrelationskoeffizient
sct-PA	single chain tissue-type plasminogen activator
scu-PA	Prourokinase (single chain urokinase-type plasminogen activator)
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEG	Thrombelastogramm

SICAM	lösliches (soluble) interzelluläres Adhäsionsmolekül
sE-Selectin	lösliches (soluble) E-Selectin
sL-Selectin	lösliches (soluble) L-Selectin
SThrombomodulin	lösliches (soluble) Thrombomodulin
TAT Komplexe	Thrombin-Antithrombin III Komplexe
tct-PA	two chain tissue-type plasminogen activator
tcu-PA	Urokinase (two chain urokinase-type plasminogen activator)
TNF	Tumornekrosefaktor alpha
t-PA	tissue-type plasminogen activator
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
UW-Lösung	University of Wisconsin Lösung
UW*-Lösung	University of Wisconsin Lösung ohne Dexamethason, Penizillin und Insulin
VWF	von Willebrand Faktor
WBLT	whole blood clot lysis time

## **GLIEDERUNG**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1.	Zusammenfassende Einleitung	7
1.2	Physiologie und hepatische Beeinflussung der Hämostase	8
1.2.1.	Gerinnungssystem	8
1.2.2.	Fibrinolytisches System	10
1.2.3.	Leukozytäre Proteasen, Zytokine und lösliche Adhäsionsmoleküle	13
1.2.4.	Thrombozyten und Gefäßwand	15
1.3.	Hämostasestörungen bei Lebererkrankungen	16
1.4.	Hämostasestörungen bei orthotoper Lebertransplantation	16
1.5.	Fibrinolyseinhibitoren bei Lebererkrankungen und orthotoper Lebertransplantation	18
<b>2.</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>ALLGEMEINER MATERIAL- UND METHODENTEIL</b>	<b>21</b>
3.1.	Patienten, operative Bedingungen	21
3.2.	Probenentnahme	21
3.3.	Bestimmung der Laborparameter	22
3.3.1.	Fibrinolyseparameter	22
3.3.2.	Gerinnungsparameter	28
3.3.3.	Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktionsmessung	28
3.3.4.	Leukozytäre Proteasen, Zytokine und lösliche Adhäsionsmoleküle	30
3.3.5.	sThrombomodulin	30
3.3.6.	Aprotinin	30
3.4.	Statistische Auswertung	30
<b>4.</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZUR THOPHYSIOLOGIE DER HÄMOSTASESTÖRUNGEN BEI ORTHOTOPER LEBERTRANSPLANTATION</b>	<b>31</b>
4.1.	Ergebnisse der Fibrinolyseparameter	32
4.2.	Diskussion der Fibrinolyseparameter	32
4.3.	Ergebnisse der Gerinnungsparameter	40
4.4.	Diskussion der Gerinnungsparameter	47
<b>5.</b>	<b>WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOPHYSIOLOGIE DER HÄMOSTASESTÖRUNGEN BEI RTHOTOPER LEBERTRANSPLANTATION</b>	<b>49</b>
<b>5.1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>49</b>
<b>5.2.</b>	<b>Bedeutung des intrinsischen fibrinolytischen Systems bei der Entwicklung einer gesteigerten Fibrinolyse während orthotoper Lebertransplantation</b>	<b>49</b>
5.2.1.	Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung der F XII-abhängigen fibrinolytischen Aktivität	49
	a) Einleitung	49
	b) Prinzip der Methode	50
	c) Evaluierung der Methode	50
	d) Detaillierte Beschreibung der Methodik	71
	e) Normalwerte und Verteilung der i-PA Aktivität	71
5.2.2.	Bestimmung der Parameter des intrinsischen fibrinolytischen Systems während orthotoper Lebertransplantation	71
5.2.2.1.	u-PA	72
5.2.2.1.1.	Ergebnisse (1)	72
5.2.2.1.2.	Diskussion (1)	78
5.2.2.1.3.	Ergebnisse (2)	79
5.2.2.1.4.	Diskussion (2)	79
5.2.2.2.	i-PA	82
5.2.2.2.1.	Ergebnisse	82

5.2.2.2.2	Diskussion	84
5.2.2.3.	Zusammenfassende Diskussion	84
<b>5.3.</b>	<b>Bedeutung der Faktor XIII Aktivität bei orthotoper Lebertransplantation</b>	<b>88</b>
5.3.1.	Ergebnisse	88
5.3.2.	Diskussion	88
<b>5.4.</b>	<b>Bedeutung leukozyitärer Aktivierungsprodukte, Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle und des Endothelzellmarkers Thrombomodulin bei der Pathogenese von Hämostasestörungen während orthotoper Lebertransplantation</b>	<b>92</b>
5.4.1.	Leukozytäre Aktivierungsprodukte	92
5.4.1.1.	Ergebnisse	92
5.4.1.2.	Diskussion	96
5.4.2.	Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle und Zytokine	97
5.4.2.1.	Ergebnisse	98
5.4.2.2.	Diskussion	103
5.4.3.	Thrombomodulin	104
5.4.3.1.	Ergebnisse	104
5.4.3.2.	Diskussion	104
<b>5.5.</b>	<b>Bedeutung der Thrombozytenfunktion während orthotoper Lebertransplantation</b>	<b>108</b>
5.5.1.	Untersuchungen der Thrombozytenfunktion während orthotoper Lebertransplantation	108
5.5.1.1.	Ergebnisse	108
5.5.1.2.	Diskussion	108
5.5.2.	Einfluß verschiedener Konservierungsflüssigkeiten auf die Thrombozytenaggregabilität in vitro	113
5.5.2.1.	Ergebnisse	114
5.5.2.2.	Diskussion	119
<b>5.6.</b>	<b>Einfluß der Spenderleber auf die Hämostase und Thrombozytenfunktion des Empfängers</b>	<b>121</b>
5.6.1.	Ergebnisse	121
5.6.1.1.	Fibrinolyseparameter	121
5.6.1.2.	Gerinnungsparameter	122
5.6.1.3.	Thrombozytenfunktionsparameter	122
5.6.2.	Diskussion	122
<b>6.</b>	<b>KLINISCHE STUDIEN ZUR THERAPEUTISCHEN BEEINFLUSSUNG DER HÄMOSTASE- UND THROMBOZYTENFUNKTIONSSTÖRUNGEN BEI ORTHOTOPER LEBERTRANSPLANTATION</b>	<b>124</b>
<b>6.1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>124</b>
<b>6.2.</b>	<b>Aprotininbolusgabe versus Infusionsgabe bei der Beeinflussung hyperfibrinolytischer Hämostasestörungen während orthotoper Lebertransplantation</b>	<b>124</b>
6.2.1.	Einleitung	124
6.2.2.	Ergebnisse	125
6.2.3.	Diskussion	139
<b>6.3.</b>	<b>Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion während orthotoper Lebertransplantation</b>	<b>141</b>
6.3.1.	Einfluß der Prostaglandin E <sub>1</sub> Infusion auf die Thrombozytenfunktion	141
6.3.1.1.	Einleitung	141
6.3.1.2.	Ergebnisse	142
6.3.1.3.	Diskussion	157
6.3.2.	Einfluß der Prostaglandin E <sub>1</sub> Infusion auf die Hämostase	158
6.3.2.1.	Einleitung	158
6.3.2.2.	Ergebnisse	158
6.3.2.3.	Diskussion	172

<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	<b>173</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>177</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>205</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>206</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Zusammenfassende Einleitung

Die Gefäßwand ist die wichtigste Matrix der Gerinnung. Bei Gefäßverletzungen kommt es zu Thrombozytenaktivierung und fakultativer Thrombozytenaggregation am freiliegenden Subendothelium. Es bildet sich ein Plättchenpfropf, der durch Fibrin, dem Produkt der parallelablaufenden Gerinnungsprozesse, stabilisiert wird. Diese Fibringerinnsel werden nach Initiierung der Gewebeheilung überflüssig und durch die Fibrinolyse (8,9,10,288) abgebaut. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse (288). Gesteigerte Bildung und/oder verzögerte Auflösung von Fibrin führen zu einer zunehmenden Fibrinablagerung mit gesteigerter Thromboseneigung während verzögerte Bildung und/oder gesteigerte Auflösung des Fibrins zu erhöhter Blutungsbereitschaft führen (9,10).

Zentrale Bedeutung in der systemischen Regulation von Gerinnung und Fibrinolyse hat die Leber. Sie ist Syntheseort wichtiger Proteaseninhibitoren und aller Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren mit Ausnahme des Faktor (F) VIII assoziierten Antigens (35,288). Gleichzeitig hat das retikuloendotheliale System der Leber eine wichtige Klärfunktion für aktivierte Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren sowie für deren Komplexe mit Inhibitoren (97,305).

Chronische Lebererkrankungen sind oft von Blutungskomplikationen begleitet (176,225,288). Neben lokalen Ursachen wie ösophagealen und gastralen Varizen und Ulzera aufgrund des portalen Hypertonus ist die gestörte Hämostase wesentlich daran beteiligt. Bei 75-85% der Patienten mit Lebererkrankungen kommt es zu komplexen Hämostasestörungen (71,279,288,358). Es können dafür Störungen im Gerinnungssystem (28,257,270,334,338,359,360), im Fibrinolysestystem (28,31,103,359), aber auch die häufig bestehende Thrombozytopenie (311), die Plättchendysfunktion (202) und eine gestörte Interaktion zwischen Thrombozyten und Gefäßwand verantwortlich gemacht werden (14,223,274,288).

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist bei terminalen Lebererkrankungen oft die einzige lebensrettende Therapie.

Im Jahr 1963 wurde zum ersten Mal von Starzl über eine OLT beim Menschen berichtet (307). Der Patient verstarb an Blutungskomplikationen durch schwerwiegende Hämostasestörungen. In den folgenden Jahren konnte die Überlebensrate bei der OLT durch Fortschritte im operationstechnischen Vorgehen und durch immunsuppressive Therapie entscheidend erhöht werden, sodaß die OLT zur etablierten Therapie für Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung werden konnte (308,247). Die Einjahresüberlebensrate liegt in großen Transplantationszentren bei 70 bis 90%.

Typische Indikationen für eine Lebertransplantation sind die Endstadien chronischer Lebererkrankungen, vor allem Zirrhosen unterschiedlicher Ätiologie, das fulminante Leberversagen, metabolische Lebererkrankungen und in geringer Anzahl nicht rezidierbare Malignome der Leber.

Ein hoher intra- und postoperativer Blutverlust bestimmt die Kurz- und Langzeitprognose der Transplantierten (111,220,309,310). Diese Blutverluste werden wiederum von der Grunderkrankung des Patienten mitbeeinflusst. So zeigen Patienten mit parenchymatösen Lebererkrankungen schwerere Gerinnungsstörungen als Patienten mit cholestatischen

Lebererkrankungen (164,178,208). Blutungskomplikationen sind bei 30-40% der intraoperativen und frühen postoperativen Todesfälle ursächlich bedeutsam (23,29,178). Verantwortlich dafür scheinen auch schwerwiegende intraoperative Hämostasestörungen zu sein (29,67,111). Mehrere Faktoren spielen hier eine Rolle. Während der OLT wird das vorher bereits gestörte hämostaseologische Gleichgewicht vor allem durch Mobilisierung und Herausnahme der Empfängerleber mit anschließender anhepatischer Phase, aber auch durch Faktoren wie prä- und intraoperative Gabe von Medikamenten (z.B. Anästhetika, Antibiotika) und durch ausgedehnte Wundflächen und hämodynamische Veränderungen (Stase nach Gefäßligatur, veno-venöser Bypass) zusätzlich beeinträchtigt. Die Implantation der Spenderleber nach mehrstündiger kalter Ischämie in Konservierungslösung kann bei und nach Perfusion eine weitere Störung der systemischen Hämostase des Empfängers bewirken. Die OLT ist eine operationstechnisch sehr aufwendige Operation mit einer Vielzahl von Gefäßmanipulationen bei krankheitsbedingter Brüchigkeit des gesamten Gewebes, hohem Pfortaderdruck und ausgedehnter Kollateralbildung (249). Vorausgegangene abdominelle Operationen stellen einen bekannten Risikofaktor für das Auftreten von schweren intraoperativen Blutungen dar (15,178). Auch bei Aszites ist von einem erhöhten intraoperativen Transfusionsbedarf auszugehen (237,238). Mittels des von Shaw 1983 eingeführten veno-venösen Bypasses (299) wird das venöse Blut von der Pfortader und der V.cava über eine Pumpe in die V.axillaris umgeleitet. Das infrahepatische venöse System und der Pfortaderkreislauf werden auf diese Weise entlastet. Dies führt zur Verminderung intestinaler und renaler Schäden bei gleichzeitiger Verbesserung des Herzzeitvolumens und effektiverer Organperfusion (249). Seit der Einführung der neuen Konservierungslösung, der University of Wisconsin Lösung (UW-Lösung) (344), konnte eine geringere ödematöse Schwellung mit schnellerer und effektiverer Revaskularisation der Spenderleber und Funktionsaufnahme der Leberzellen erreicht werden. Darüberhinaus konnte bei Verwendung der UW-Lösung die kalte Ischämiezeit auf bis zu 24 Stunden verlängert werden (154,163,259,329,344). Die Evaluierung des Spenderorgans und die präoperative Planung konnte dadurch verbessert werden und führte zur Erhöhung der Überlebensrate (329,330). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, daß auch bei Verwendung der UW-Lösung eine Ischämiezeit, die länger als 12 Stunden dauert, ein Risiko für Transplantatfunktion und Patientenüberleben darstellt (1).

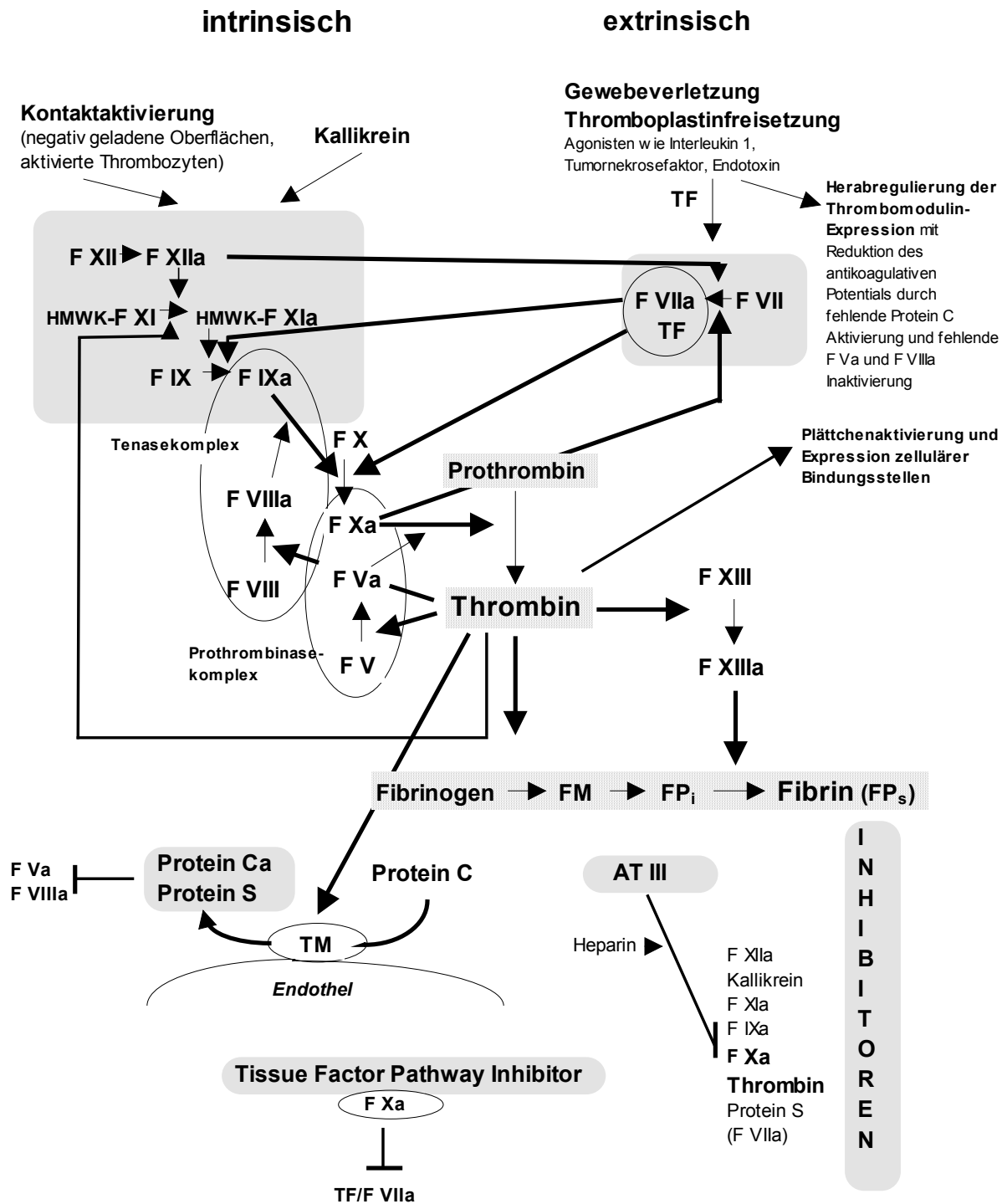
In der Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Virchow-Klinikum, werden seit Oktober 1988 OLTs durchgeführt. Dabei wurde eine niedrig dosierte Aprotinengabe (Boli von 3 x 0.5 Millionen KIU (kallikrein inactivator units), Trasylol, Bayer, Leverkusen, Deutschland) versuchsweise eingeführt und aufgrund ihrer empirischen Wirksamkeit zur Vermeidung diffuser Blutungen bei den folgenden Transplantationen beibehalten (251). Die durchschnittliche Einjahresüberlebensrate der Lebertransplantierten liegt bei über 90 %.

## **1.2. Physiologie und hepatische Beeinflussung der Hämostase**

### **1.2.1. Gerinnungssystem (Abbildung 1)**

Die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems - über F XII oder über das Kallikrein/Kininogensystem durch Kontaktaktivierung - führt ebenso wie die des extrinsischen Systems - durch Freisetzung von Gewebethromboplastin (tissue factor) - über die gemeinsame Endstrecke zur Thrombinentstehung. Es bilden sich Fibrinmonomere, die





**Abbildung 1:** Das Gerinnungssystem

(AT III: Antithrombin III, Faktor a: aktivierter Faktor, FM: Fibrinmonomere, Fp<sub>i</sub>: instabiles Fibrinpolymer, Fp<sub>s</sub>: stabiles Fibrinpolymer, HMWK: hochmolekulares Kininogen, TF: Gewebefaktor, TM: Thrombomodulin)

zunächst zu löslichen und unter dem Einfluß von F XIIIa zu unlöslichem Fibrin polymerisieren (9,124). F XIII wird durch Thrombin aktiviert. Ein Fehlen oder eine pathologische Variante des F XIII führen zu Blutungskomplikationen und gestörter Wundheilung (229).

Eine Modulation erfährt dieser Gerinnungsprozeß durch verschiedene Proteaseinhibitoren. Antithrombin III (AT III) hemmt vorrangig Thrombin und F Xa. Es entstehen Thrombin-AT III (TAT) bzw. F Xa-AT III Komplexe. Protein C mit seinen Cofaktoren Protein S und F V hemmt nach Aktivierung durch Thrombin am endothelialen Thrombomodulin (263) v.a. die Faktoren Va und VIIIa und den Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) (9). Die Bewertung der Protein S Spiegel ist kompliziert durch die Tatsache, daß Protein S im Plasma als freies und funktionell aktives Protein S und als reversibler inaktiver Komplex mit dem C4b-Bindungsprotein, einem Regulationsprotein des Komplementsystems, vorkommt (69,70).

### **1.2.2. Fibrinolytisches System (Abb.2) (123)**

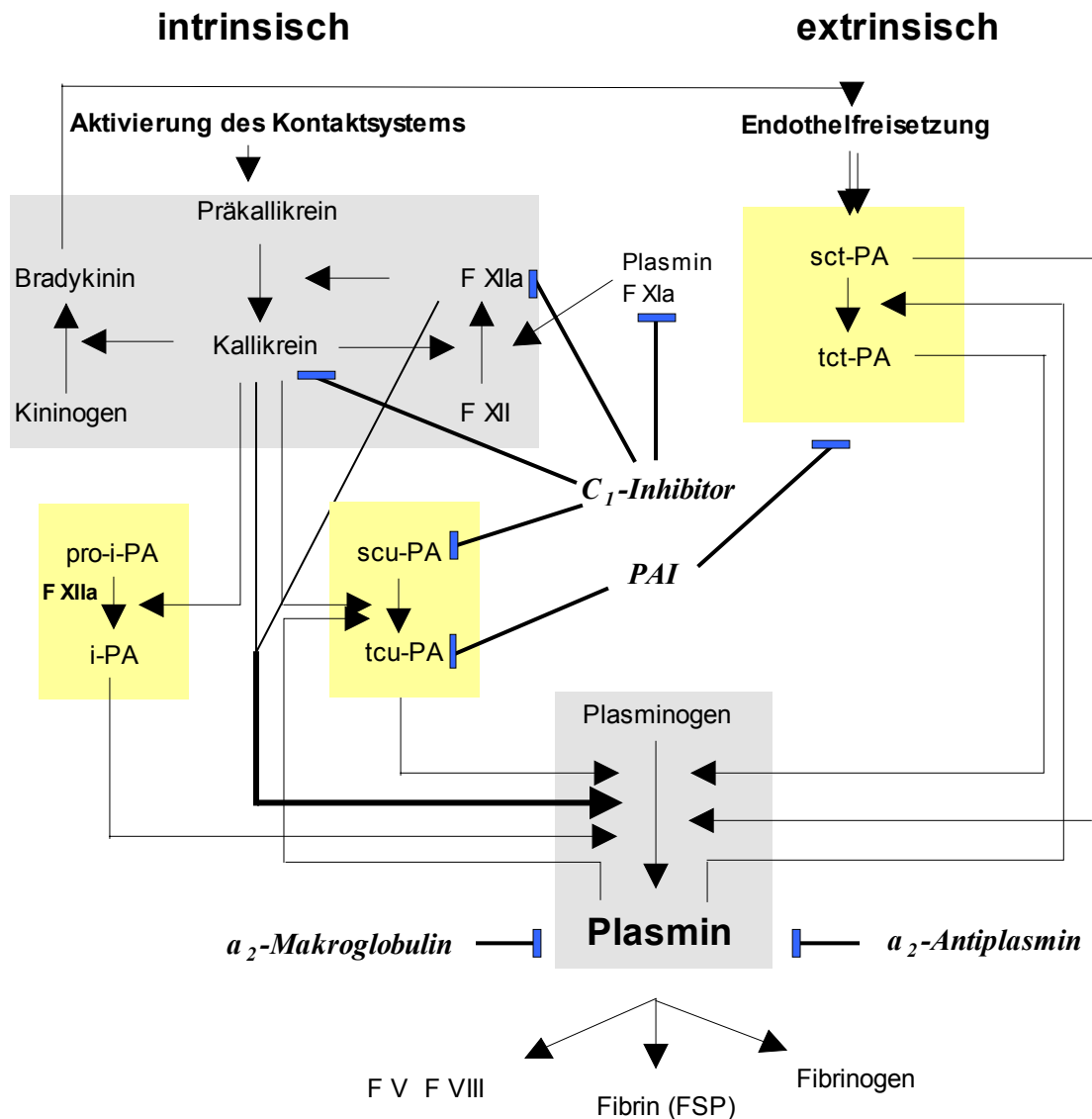
Die Fibringerinnsel werden nach Blutstillung und Initiierung der Gewebeheilung (8) durch fibrinolytische Prozesse abgebaut (Abb.2). Zentrale Reaktion der Fibrinolyse ist die Aktivierung von Plasminogen zur Protease Plasmin durch Plasminogenaktivatoren (10,43,123) wobei während des Gerinnungsprozesses Plasminogen auch in das entstehende Fibringerinnsel eingebaut wird (48).

Bei den physiologischen Plasminogenaktivatoren können zwei Gruppen unterschieden werden: die exogene Gruppe, bei der der Plasminogenaktivator vom Endothel freigesetzt wird, und die endogene Gruppe, bei der im Plasma bereits vorhandene Proaktivatoren aktiviert werden (10).

Der Gewebe-Plasminogenaktivator (t-PA, tissue-type plasminogen activator) wird im Gefäßendothel vor allem des venösen Systems als einkettiges Molekül (scf-PA, single chain t-PA) synthetisiert, gespeichert und daraus durch bestimmte Stimuli wie venöse Stauung, physische Arbeit, Anoxie, Azidose und Gabe von 1-Desamino-8-D-arginin-vasopressin (DDAVP), aber auch durch Thrombin, Bradykinin und aktiviertes Protein C (57,80,349) freigesetzt. T-PA ist auch in seiner einkettigen Form aktiv. Plasmin oder Trypsin spalten scf-PA zur zweikettigen Form (tct-PA, two chain t-PA). Scf-PA und tct-PA werden im folgenden zu t-PA zusammengefaßt. Unter Ruhebedingungen ist die Konzentration des freien t-PA Antigens, gemessen als t-PA Aktivität, im Plasma niedrig, da 95-97% des t-PA an den Inhibitor PAI gebunden und funktionell inaktiv sind (306). Ist PAI gesättigt, so erhöht sich die Konzentration und somit die Aktivität des freien t-PA. T-PA hat eine kurze biologische Halbwertszeit von ca. 5 Minuten (340) und zeichnet sich durch eine hohe Fibrinaffinität aus (323). Die Aktivierung von Plasminogen durch t-PA ist in Gegenwart von Fibrin 200-400fach gesteigert (10).

Das intrinsische fibrinolytische System wird in vivo erst nach Aktivierung von Proaktivatoren bedeutsam. Die Aktivierung kann in vitro durch Kontakt mit Fremdoberflächen wie Glas, Kaolin oder negativ geladenen Polysacchariden wie Dextransulfat erheblich gesteigert werden. Diese Kontaktaktivierung verstärkt die Interaktion von F XII, Präkallikrein und HMW (high molecular weight) Kininogen (104,322) und führt damit zu aktiviertem F XII und Kallikrein. In vitro werden im Blut zwei Gruppen von intrinsischen Proaktivatoren

# Fibrinolyse-System



**Abbildung 2:** Das fibrinolytische System

(i-PA: intrinsischer Plasminogenaktivator, pro i-PA: Vorstufe des i-PA, scu-PA: einkettige Prourokinase, tct-PA: zweikettige Urokinase, PAI: Plasminogenaktivatorinhibitor, sct-PA: einkettige Form des Gewebeplasminogenaktivators, tct-PA: zweikettige Form des Gewebeplasminogenaktivators, FSP: Fibrinolyseprodukte)

unterschieden (183): die F XII-abhängigen und die F XII-unabhängigen Proaktivatoren. Die einkettige Pro-Urokinase (scu-PA, single chain urokinase-type plasminogen activator) ist F XII unabhängig (184) und kann in sehr limitiertem Umfang auch selbst Plasminogen aktivieren (211). Sie kann durch Plasmin, Kallikrein (147) und Kathepsin B (191) in ihre fibrinolytisch weitaus aktivere zweikettige Form (tcu-PA, two chain urokinase-type plasminogen activator) überführt werden. U-PA (urokinase-type plasminogen activator, Urokinase) konnte im Urin und Plasma nachgewiesen werden und wird als scu-PA von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Pneumozyten, Fibroblasten und Epithelzellen sezerniert (36,203,286,315).

In vitro sind ca. 50% der intrinsischen fibrinolytischen Aktivität dem u-PA zuzurechnen (186,187). Aktivierter F XII (F XIIa) und Kallikrein sind ebenfalls in der Lage Plasminogen zu aktivieren (58,100,181,188), jedoch ist ihre spezifische Aktivität gegenüber Plasminogen im Vergleich zu tcu-PA um ein vierfaches schwächer (161,230). Ihr Gesamtanteil am intrinsischen fibrinolytischen Potential beträgt 15% (186,188). Die verbleibenden 35% intrinsischer fibrinolytischer Aktivität werden einem F XII-abhängigen intrinsischen Proaktivator zugesprochen, bei dessen Aktivierungsprozeß Kallikrein und F XIIa eine entscheidende Rolle spielen (180,181,186,188). Dieser F XII-abhängige Plasminogenaktivator kann nicht von u-PA und t-PA Antikörpern gehemmt werden. Seine kleinste Einheit im SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis) ist ein inaktives 110 kDa (korrigiert auf 135 kDa, Peter van Boheme et al., Gaubius Institut, Leiden, Niederlande, unveröffentlicht) einkettiges Polypeptid, das nach Aktivierung des Kontaktsystems in ein zweikettiges, über eine Disulfidbrücke verbundenes, Molekül überführt wird (21). Der isoelektrische Punkt liegt mit einem pH von 4.8 deutlich unter dem von t-PA und u-PA. Im SDS-PAGE konnte weiterhin gezeigt werden, daß im Polypeptid des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators eine Untereinheit von 37 kDa existiert, die sich durch u-PA Antikörper markieren läßt (21), sodaß eine gewisse Homologie zwischen u-PA und dem F XII-abhängigen Plasminogenaktivator zu bestehen scheint.

Der intrinsischen fibrinolytischen Aktivität steht ein vielfach höheres Inhibitorpotential gegenüber (193). Um die Aktivität des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators - bei noch unbekannter Molekularstruktur - ex vivo bestimmen zu können, muß man erstens die Proaktivatoren aktivieren und zweitens das Inhibitorpotential reduzieren. Beide Schritte werden in der sog. Dextransulfat-stimulierten Euglobulinfraktion (DEF) realisiert (180,188).

Über die klinische Bedeutung des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators ist wenig bekannt. Munkvad et al. (245,246) konnten zeigen, daß das Risiko eines kardialen Reinfarktes nach initialer thrombolytischer Therapie mit rekombinantem t-PA bei niedriger F XII-abhängiger Plasminogenaktivator-Aktivität höher ist. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva mit geringem Östrogengehalt führte zu einem Anstieg der F XII-abhängigen fibrinolytischen Aktivität (157) - eventuell zurückführbar auf einen geänderten Abbau in der Leber.

Die Aufgabe des fibrinolytischen Systems ist es, „funktionslose“ Fibrinablagerungen abzubauen. Diese Selektivität kommt vorrangig dem extrinsischen Plasminogenaktivator t-PA zu, da er - endothelial freigesetzt - in Gegenwart von Fibrin in seiner Aktivität um ein Vielfaches gesteigert wird (10). Fibringebundener t-PA führt zur Bindung von Plasmin. Plasmin baut auf der einen Seite Fibrin ab, auf der anderen Seite initiiert es die Aktivierung des intrinsischen fibrinolytischen Systems (354), wodurch die gesamte fibrinolytische

Aktivität exponentiell gesteigert wird (188). Das intrinsische fibrinolytische System braucht sozusagen einen Trigger, einen Aktivierungsmechanismus, um in Aktion zu treten (158). Diese Triggerfunktion kann aber auch unabhängig von einer t-PA Freisetzung direkt das Kontaktsystem übernehmen wie z.B. beim Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen bei der extrakorporalen Zirkulation (95,188,189,341).

Der wichtigste Plasmininhibitor ist  $\alpha_2$ -Antiplasmin. Es entstehen inaktive Plasmin- $\alpha_2$ -Antiplasmin (PAP)-Komplexe (356).  $\alpha_2$ -Antiplasmin kann sich auch an Plasminogen binden und mit Hilfe von F XIIIa gleichzeitig an Fibrin gekoppelt werden. Bei Verbrauch von  $\alpha_2$ -Antiplasmin wie z.B. bei ausgeprägter Fibrinolyse werden Plasmin und Plasminogenaktivatoren von  $\alpha_2$ -Makroglobulin durch kovalente Bindung inhibiert. Die entstehenden Komplexe werden vom retikuloendothelialen System abgebaut (113). Der C<sub>1</sub>-Inhibitor (292) hemmt neben den Faktoren der Kontaktaktivierung (XIa, XIIa und Kallikrein) Plasmin und t-PA (31,205), wobei die Bedeutung der Hemmung von Plasmin und t-PA in vivo noch unzureichend geklärt ist. PAI-1 ist der bedeutendste Inhibitor von t-PA (47,195,337) und t-PA (306). PAI-1 ist ein Akute-Phase-Protein, das vor allem aus den Gefäßendothelzellen freigesetzt wird (196). Hepatozyten und andere Zellen in Zellkulturen produzieren ebenfalls PAI-1. Auch aus den alpha-Granula der Thrombozyten kann PAI-1 bei Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden. Dieser Pool trägt jedoch nicht zur Plasmakonzentration unter physiologischen Bedingungen bei (306). Protein C hemmt PAI-1 (143). Neben PAI-1 sind bisher noch drei weitere PAI-Formen (PAI-2, PAI-3, PAI-4) beschrieben worden (7,99,172,197). PAI-2 wird hauptsächlich von der Plazenta und zweitrangig von Neutrophilen gebildet. PAI-3 ist gleichzusetzen mit dem Protein C-Inhibitor, der u-PA, aktiviertes Protein C, F Xa, Kallikrein und andere Serinproteasen hemmt. Er weist eine hohe Affinität zur Endothelzelloberfläche und extrazellulären Matrix auf. PAI-4 (=Protease Nexin 1) inaktiviert Thrombin und u-PA, wird von glatten Muskelzellen sezerniert und befindet sich auf der Oberfläche von Thrombozyten. Die Plasmakonzentration ist sehr gering. Da diesen PAI Formen eine geringe (PAI-2, PAI-4) bzw. noch unvollständig geklärte (PAI-3) systemische Bedeutung zukommt, beschränken wir uns auf die Bestimmung von PAI-1 und sprechen im folgenden vereinfacht von PAI.

### 1.2.3. Leukozytäre Proteasen, Zytokine und lösliche Adhäsionsmoleküle

Ausgedehnte Gewebeschädigung wie z.B. bei Infektionen oder Traumata führen zur Akutphase-Reaktion. Es kommt primär zur lokalen Reaktion mit Thrombusbildung, Gefäßdilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität. Dieses ermöglicht die Invasion von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in das geschädigte Gewebe. Die Leukozyten werden aktiviert, und je nach betroffener Leukozytensubpopulation werden unterschiedliche Mediatoren freigesetzt. Diese Mediatoren führen sekundär zu systemischen Reaktionen, die verschiedene Systeme wie auch das Gerinnungssystem (136) mit möglicher Entwicklung einer Verbrauchskoagulopathie (disseminated intravascular coagulation, DIC) betreffen können.

Tumornekrosefaktor alpha (TNF), ein antitumorales Zytokin, wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen und peripheren T-Zellen freigesetzt (269). Am Endothel verstärkt TNF die Anlagerung und Durchwanderung von Granulozyten und Monozyten und induziert die Expression von Gewebefaktor in Monozyten und Endothelzellen (248). Darüberhinaus sprechen Studien für eine Rolle des TNF bei DIC (342). Erhöhte TNF Spiegel konnten auch

vor der klinischen Manifestation einer Leberallograftabstoßung nachgewiesen werden (94,149). TNF Spiegel in der ersten Woche nach OLT scheinen ein wertvoller Parameter für die Empfängerakzeptanz des Transplantats zu sein (149).

Neopterin wird bei der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin, einem bedeutenden Kofaktor der Hydroxylierung von Tyrosin und Tryptophan, als Pyrazino-Pyrimidin aus Guanosintriphosphat freigesetzt. Es spielt eine wichtige Rolle in der Synthese von Serotonin und Katecholaminen (253). Es wird aus aktivierten Monozyten und Makrophagen freigesetzt (332). Die biologische Bedeutung von Neopterin ist kaum bekannt (93). Serumwerte von Neopterin stiegen signifikant 24 Stunden nach TNF Gabe bei 6 Gesunden an (271). Die Infusion von TNF und gamma-Interferon führte zu einem signifikanten Anstieg des Neopterins 24 Stunden später bei Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen (293).

Kathepsin B ist eine lysosomale Cysteinproteinase, die aus aktivierten Makrophagen freigesetzt wird, und Elastase ist eine lysosomale Serinproteinase, die bei Aktivierung polymorphzelliger Granulozyten vermehrt im Plasma nachzuweisen ist. Beide werden als wichtige unspezifische Entzündungsmediatoren angesehen (6). Elastase hat in vitro die Fähigkeit zahlreiche Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren (117) zu spalten, jedoch wird dieses in vivo durch den physiologischen Inhibitor  $\alpha_1$ -Antitrypsin verhindert. Dieser Hemmechanismus kann lokal durch hohe Elastasekonzentrationen oder durch Sauerstoffradikale - durch polymorphzellige Granulozyten freigesetzt - unterbrochen werden (260).

Proteinasen aus Neutrophilen scheinen an der Aktivierung der Plasminogenaktivatoren einen Anteil zu haben (191,218,219). Darüberhinaus zeigten eine Reihe von Untersuchungen (158,199,201), daß Mediatoren aus aktivierten, polymorphzelligen Granulozyten eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Organkomplikationen bei Intensivpatienten spielen und daß hier der Elastase (158,200) und den lysosomalen Proteinase aus Makrophagen, wie Kathepsin B (6), eine diagnostische und prognostische Bedeutung zukommen.

Interleukin (IL)-6 ist ein Phosphoglykoprotein und wird durch Stimulation von IL-1 und TNF aus Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen synthetisiert und freigesetzt. Es ist der wichtigste Mediator der Regulation der hepatischen Proteinsynthese in der Akutphase (2).

IL-8, ein Peptid, wird von Endothelzellen, Makrophagen und Leukozyten gebildet. Auch hier bewirken IL-1 und TNF Genexpression auf der Transkriptionsebene. Es bindet spezifisch Neutrophile, jedoch keine Monozyten und scheint durch Induktion der Neutrophilendegranulation die kapilläre Durchlässigkeit zu erhöhen (86).

Die Mediatoren wirken über Wechselwirkung mit spezifischen, membrangebundenen Rezeptoren der Zielzellen (61,217,268,269,303,159). Die Adhäsion der Neutrophilen an das Endothel verläuft über zwei Schritte. Zunächst kommt es zur vorübergehenden Anlagerung ('rolling') vermittelt durch Selectine - E-Selectin auf Endothelzellen und L-Selectin auf der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen und Lymphozyten (294). Im zweiten Schritt kommt es zur festen Anlagerung der Neutrophilen vermittelt durch Integrine wie z.B. ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül) auf Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen (294). Während einer Akutphase-Reaktion können auf diese Weise Leukozyten an das Endothel angelagert werden, die dann zwischen den Endothelzellen in das Gewebe einwandern.

#### 1.2.4. Thrombozyten und Gefäßwand

Wird die Intima der Gefäßwand z.B. während Operationen verletzt, entfällt die Schutzfunktion endothelialer Mediatoren. An der nun thrombogenen Gefäßwand kommt es zu einer von Willebrand Faktor (vWF) Ag und Fibronektin vermittelten Adhäsion der Thrombozyten an das subendotheliale Kollagen und zur Thrombozytenaktivierung. Zahlreiche Faktoren, wie Adenosindiphosphat (ADP), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und Arachidonsäuremetabolite, werden durch Exozytose (88) freigesetzt und können weitere Thrombozyten aktivieren (125). Bei überschwelliger Aktivierung (4) kommt es zur Thrombozytenaggregation mit Ausbildung eines hämostatischen Plättchenthrombus. Die Thrombozytenaktivierung kann die plasmatische Gerinnung fördern. Dieses geschieht durch Bereitstellung von Phospholipiden (Plättchenfaktor 3), auf der F X und Prothrombin aktiviert werden. Stimulierte Thrombozyten können neben Freisetzung von Fibrinogen, PAI, vWF u.a. auch das intrinsische plasmatische Gerinnungssystem und Fibrinolysesystem aktivieren: für ADP-stimulierte Thrombozyten konnte F XII Aktivierung (346) und für Kollagen-stimulierte Thrombozyten eine Aktivierung von F XI (345) nachgewiesen werden.

In vitro kann die Thrombozytenaggregation durch verschiedene Substanzen wie ADP, Adrenalin, Arachidonsäure, Kollagen, PAF, Ristocetin und Thrombin ausgelöst werden. Diese Agonisten werden an unterschiedlichen Membranrezeptoren der Thrombozyten gebunden und aktivieren den Phosphatidylinositol-Metabolismus (46).

Aktivierte Endothelzellen haben die Fähigkeit die Gerinnungsbildung z.B. durch Expression von "tissue factor" (Gewebethromboplastin) zu induzieren (59). Auf der anderen Seite setzen Endothelzellen Substanzen, wie Prostazyklin (350), Glykosaminoglykane (53) und t-PA (215), frei, die hemmend in den Gerinnungsbildungsprozeß eingreifen. Freisetzungsprodukte von Endotoxin-stimulierten Makrophagen und Monozyten, wie TNF und IL-1, können endotheliale Eigenschaften und damit die Hämostase beeinflussen. TNF z.B. kann Endothelzellen stimulieren, PAF (40), 'platelet-derived growth factor' (112) und 'tissue factor-like protein' mit prokoagulatorischer Aktivität (248) zu sezernieren.

Thrombomodulin ist ein Oberflächenrezeptor von Gefäßendothelzellen. Wenn Thrombin sich an endotheliales Thrombomodulin bindet, verliert es seine prokoagulatorischen Eigenschaften und im Thrombin-Thrombomodulinkomplex gewinnt es seine Fähigkeit, das Zymogen Protein C zu aktivieren. Auf diese Weise spielt Thrombomodulin eine wichtige Rolle als antikoagulierendes Protein der Gefäßwand (51,74,82). Immunhistologisch konnte nachgewiesen werden, daß Thrombomodulin an der Oberfläche von Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße in allen Organen mit Ausnahme des Gehirns (151,227) vorhanden ist. Darüberhinaus konnte Thrombomodulin auf dem epidermalen Epithel, in Makrophagen und in menschlichen Thrombozyten (74,316) nachgewiesen werden. Eine kleinere Form des Thrombomodulins, das lösliche (soluble(s)) Thrombomodulin (sThrombomodulin), konnte aus menschlichem Blut und Urin isoliert werden (74,150). Die Struktur von sThrombomodulin scheint vergleichbar mit dem löslichen Protein zu sein, das nach proteolytischer Modifikation von Thrombomodulin mit Verlust eines Teils der transmembranen Domäne (74) erhalten wird. Daher wird angenommen, daß sThrombomodulin im Plasma das Produkt verletzten Gefäßendothels (153) oder Folge einer proteolytischen Wirkung von Proteasen ist.

### 1.3. Hämostasestörungen bei Lebererkrankungen

Die häufigste chronische Lebererkrankung ist die Leberzirrhose, d.h. der diffuse knotige Umbau des Lebergewebes. Hauptursachen sind virale Hepatitis und Alkoholabusus. Seltener Ursachen sind primäre und sekundäre biliäre Zirrhose, Wilson'sche Krankheit, Hämochromatose,  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel und kryptogene Zirrhose. Akutes oder fulminantes Leberversagen führt innerhalb von Tagen bis Wochen nach Beginn der Symptome zur Enzephalopathie. Als Ursache sind hier fulminant verlaufende Hepatitis, Intoxikationen (Paracetamol-, Knollenblätterpilz-, Tetrachlorkohlenstoffvergiftungen) oder plötzliche Gefäßveränderungen (Budd-Chiari Syndrom) zu nennen. Mit unterschiedlichem zeitlichen Verlauf kommt es im Endstadium einer chronischen und akuten Lebererkrankung zu ausgeprägtem hepatozellulärem Funktionsausfall (297). Bezogen auf das Gerinnungssystem sind eine reduzierte Synthese der meisten Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren sowie eine inhibierte Clearance aktivierter Gerinnungsfaktoren und der meisten Inhibitor Komplexe die Folge. Im Endstadium einer chronischen Lebererkrankung kommt es komplizierend zur portalen Hypertension mit ausgeprägtem Kollateralkreislauf, der darüber hinaus die lokale Clearancefunktion der Leber umgeht und die Blutungsbereitschaft (z.B. aus Ösophagusvarizen) erhöht (25,41,176,226,289). Das Blutungsrisiko wird weiterhin gesteigert durch Thrombozytopenie (311), Thrombozytendysfunktion (14,202,330), Synthese dysfunktioneller Gerinnungsfaktoren wie Dysfibrinogenämie und Dysprothrombinämie (257,280) und DIC (25,28,334,338).

Goodpasture zeigte 1914 als erster, daß es bei chronischer Leberinsuffizienz zu Zeichen einer gesteigerten Fibrinolyse kommt (103). Daß diesem Phänomen eine reduzierte hepatische Clearance der Plasminogenaktivatoren zugrunde liegt, wurde von Fletcher et al. 1964 erstmalig vermutet (87). Spätere Untersuchungen zeigten sowohl erhöhte Spiegel von t-PA (30,162) und u-PA Ag (30,75) als auch verminderte Spiegel der Fibrinolyseinhibitoren (28,169,256) wie  $\alpha_2$ -Antiplasmin (3) bei chronischen Lebererkrankungen. Plasminogenspiegel sind bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen erniedrigt, erklärbar durch die herabgesetzte hepatische Synthese und den erhöhten peripheren Verbrauch bei gesteigerter Fibrinolyse (56,87,311). Bei Patienten mit Leberzirrhose scheint es zu einer gesteigerten Prothrombinaktivierung mit erhöhten TAT Spiegeln zu kommen. Differentialdiagnostisch muß hier jedoch auch an eine Konzentrationssteigerung durch herabgesetzte hepatische Clearance gedacht werden. Eine DIC-artige Konstellation scheint sich erst bei deutlich erniedrigten AT III Werten zu entwickeln (11).

### 1.4. Hämostasestörungen bei orthotoper Lebertransplantation

Während der OLT treffen vorbestehende multifaktorielle Hämostasestörungen, die aufwendige Operation mit zahlreichen Gefäßmanipulationen und der Ersatz der Leber - als Synthese- und Clearanceorgan der Hämostasefaktoren - aufeinander. Die Verbesserung der Operationstechnik, der Anästhesie, der Immunsuppression und der Spenderorgankonservierung haben die intra- und postoperative Letalität entscheidend senken können. Den Hämostasestörungen bei der OLT mit oft ausgedehnten Blutverlusten kommt primäre Bedeutung für die intra- und postoperative Prognose zu (23,29,101). Diese hämostaseologischen Veränderungen können während der OLT zu den drei Operationsphasen in Beziehung gesetzt werden, der präanhepatischen Phase, in der die Empfängerleber



mobilisiert und ein veno-venöser Shunt von der Pfortader und V.femoralis zur V.axillaris vorbereitet wird, die anhepatische Phase, die mit dem Verschluß der Blutversorgung der Empfängerleber beginnt, und die Reperusionsphase, die mit Öffnung der A.hepatica Anastomose beginnt und bis zum Operationsende andauert. Vor Öffnung der V.cava Anastomose wird die Spenderleber mit arteriellem Blut (ca. 0.5 Liter) aus der A.hepatica gespült, das sog. Flushing der Leber.

In der anhepatischen Phase und Reperusionsphase besteht ein hoher Transfusionsbedarf.

In allen Phasen der OLT hängt der Blutverlust vom präoperativen Gerinnungsstatus, von den Operationsbedingungen, wie Gefäßstatus, eventuelle Adhäsionen durch Voroperationen und dem Ausprägungsgrad einer portalen Hypertension, und nicht zuletzt von der chirurgischen Erfahrung des Operateurs ab (101,178,326). In der anhepatischen Phase zeigten wenige Untersuchungsergebnisse Zeichen einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung vor allem bei Patienten mit Lebermalignomen (145). Diese waren mit Gerinnungsaktivierungen bei anderen Leberoperationen vergleichbar (145,170,287).

Während der anhepatischen Phase kommt es zu einem stärkeren Blutverlust. Welche hämostaseologischen Veränderungen primär für diesen erhöhten Blutverlust verantwortlich zu machen sind, wird kontrovers diskutiert. Ältere Studien berichten von Zeichen einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung in der anhepatischen Phase der OLT (24,26,204,265). Es wird ein gleichzeitiger Abfall von Gerinnungsfaktoren (F I, F II, F V, F VII, F VIII, F X), Inhibitoren (AT III) und Thrombozyten beobachtet (27,108,213,233,234,239,265,266). Dabei wird der vollständige Wegfall der Synthese- und Clearancefunktion der Leber als auslösender Faktor diskutiert (27,239,272). Dieses konnte in nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden (165,207,209,262).

Sicherlich haben Menge und Art des Volumenersatzes einen entscheidenden Einfluß auf die Patientenhämostase und können ihrerseits ohne stattfindende DIC zu einer Abnahme sämtlicher Gerinnungsproteine führen. Auch eine gesteigerte Aktivierung des Fibrinolysesystems scheint zur erhöhten Blutungsneigung beizutragen. So wurden in der anhepatischen Phase Zeichen einer Hyperfibrinolyse im Thrombelastogramm und als Verkürzung der Euglobulinlysezeit gemessen (24,108,164,165,170,265). Der extrinsischen fibrinolytischen Aktivität mit t-PA scheint eine wesentliche Bedeutung in der Genese dieser gesteigerten Fibrinolyse zuzukommen (78,119,263,275). Die kurze Halbwertszeit von t-PA (3-5 Minuten (10)) und der Wegfall der hepatischen t-PA Clearance bieten eine Erklärung für die t-PA Aktivitätserhöhung in der anhepatischen Phase. Ein Teil der Hyperfibrinolyse kann auch unabhängig davon reaktiv bei Gerinnungsaktivierung bedingt sein (299). In Analogie zum kardiopulmonalen Bypass ist es vorstellbar, daß es auch bei der OLT durch den venovenösen Shunt als Fremdoberfläche zur Aktivierung des kontaktabhängigen intrinsischen Fibrinolysesystems kommt (93,189,341).

Mit Beginn der Reperusionsphase kommt es klinisch zur Steigerung der Blutungsneigung (237,238,274). Dabei müssen neben den durch die anhepatische Phase vorbestehenden Hämostasestörungen neu hinzukommende, postreperfusionelle Faktoren berücksichtigt werden.

Zwischen Entnahme und Reperfusion wird die Spenderleber in einer kalten Konservierungslösung aufbewahrt. Während dieser kalten Ischämiezeit kommt es durch reduzierten Zellstoffwechsel bei Endothelzellen, Hepatozyten und bei an der Gefäßwand verbleibenden Blutzellen zu Schädigungen mit Diffusionsstörungen und Zelluntergängen. In

schlecht präservierten Transplantaten konnte eine Desquamation von Endothelzellen nachgewiesen werden (261). Die Bedeutung dieses Prozesses zeigt sich bei der Beobachtung, daß bei humanen und tierexperimentiellen OLTs die Schwere der Hämostasestörungen von der Qualität des Spenderorgans (27,170,220) und der Länge der kalten Ischämiezeit (38,171,265,348) abhängt. Auch geben experimentelle Untersuchungen Anlaß zu der Vermutung, daß intra- und postoperative Komplikationen bei OLT eng verknüpft sind mit der Freisetzung toxischer Mediatoren aus aktivierten Kupfferzellen (39,54), geschädigten Endothelzellen (38,39) und Leukozyten (6,320), wie Proteinase, TNF, Leukotriene und Oxygenradikale (54).

Kontrovers wird diskutiert, ob postreperfusionell eine beginnende DIC mit Abfall von Gerinnungsfaktoren, AT III und Thrombozytenzahl (27,108,170) und/oder eine Hyperfibrinolyse (165) primär für die gesteigerte Blutungsneigung verantwortlich zu machen ist (27,73,78,164,207,209,213,263,266,275,313).

### **1.5. Fibrinolyseinhibitoren bei Lebererkrankungen und orthotoper Lebertransplantation**

Zur therapeutischen Beeinflussung der erhöhten Blutungsbereitschaft bei OLT wurden zunächst synthetische Fibrinolyseinhibitoren wie Epsilonaminocaprinsäure (EACA) (in Deutschland nicht verfügbar) und Tranexamsäure verwendet, die durch Hemmung der Plasminogen- und Plasminbindung an Fibrin oder Fibrinogen einer (Hyper-)Fibrinolyse entgegenwirken (325). So konnte ein günstiger Effekt von EACA bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und gleichzeitiger Hyperfibrinolyse nachgewiesen werden (206,255). Bei OLT konnte in einigen nicht-kontrollierten Studien über einen erfolgreichen Einsatz dieser Medikamentengruppe bei klinisch manifesten Hyperfibrinolyse berichtet werden (165,263), während dies in einer größeren Studie nicht bestätigt werden konnte (52). In anderen Studien wurde nachgewiesen, daß es während einer EACA-Therapie sowohl tierexperimentell (170,265) als auch bei Patienten mit Lebererkrankungen und Hyperfibrinolyse zu vermehrten thromboembolischen Komplikationen kommt (62,240,278). Der differenzierte Einsatz von synthetischen Antifibrinolytika setzt die Diagnose einer manifesten Hyperfibrinolyse voraus und eignet sich daher in der Regel aufgrund der prothrombogenen Effekte nicht zur Blutungsprophylaxe. Eine neuere Studie (168) zeigte bei kontinuierlicher Gabe von kleinen Dosen der Tranexamsäure geringere Fibrinolysezeichen bei jedoch vergleichbarem Transfusionsbedarf, während eine andere Studie (33) bei hochdosierter Gabe von Tranexamsäure eine deutliche Verminderung des Transfusionsbedarfs verzeichnete. Aprotinin ist ein parenteral zu applizierender Proteinaseinhibitor, der aus Rinderorganen gewonnen wird (92). Es wurde unabhängig von Kraut et al. 1930 (194) als Kallikreinaktivator und von Kunitz und Northrop 1936 (198) als Trypsinaktivator im Rinderpankreas entdeckt. Aprotinin ist ein einkettiges Polypeptid mit einer Halbwertszeit von 2 Stunden bei Normalpersonen (92,339). Aprotinin hemmt ein breites Spektrum von Serinproteasen, vor allem Plasmin, Kallikrein und Trypsin. Die erforderliche Hemmdosis ist bei den einzelnen Enzymen unterschiedlich. So ist z.B. eine Konzentration von 50 KIU (kallikrein inhibitor units)/ml notwendig, um Plasmin zu hemmen, während für Kallikrein 200 KIU/ml benötigt werden (92). Aprotinin wird über die renalen Glomeruli filtriert und im Anschluß an die Tubuli gebunden. Dort wird es mit Verzögerung von den renalen Lysosomen abgebaut (352). Aprotinin wirkt vergleichsweise schwach immunogen (352), und die Inzidenz

von allergischen Reaktionen ist niedrig (19,89,324). In einer Zusammenstellung von 671 Patienten mit kardialen Operationen und intraoperativer Aprotininapplikation wurden nur in 4 Fällen allergische Reaktionen und bei 7 Patienten eine renale Dysfunktion beobachtet (19). Bei Herzoperationen mit kardiopulmonalem Bypass konnte mit Hilfe hoher Aprotiningaben (5 Millionen KIU/Operation) (72,89,278) der Transfusionsbedarf hochsignifikant gesenkt werden, ohne daß dabei thromboembolische Komplikationen auftraten. Auch bei Polytraumapatienten wurden hohe Dosen (17.5 Mill. KIU/24h) komplikationslos vertragen; sie führten zur deutlichen Verminderung des Transfusionsbedarfs (49). Diese Ergebnisse ließen den empirischen Einsatz von Aprotinin bei Hyperfibrinolyse im Rahmen der OLT prüfenswert erscheinen (251).

## **2. ZIEL DER ARBEIT**

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist in den letzten Jahren zu einer etablierten Methode in der Behandlung von infausten Lebererkrankungen geworden und hat deren Prognose wesentlich verbessern können. Während der Lebertransplantation kommt es immer wieder zu bedrohlichem intraoperativem Blutverlust, der sowohl die Kurz- als auch die Langzeitprognose der Lebertransplantierten entscheidend beeinflussen kann. Das pathophysiologische Wissen der Hämostaseveränderungen während OLT ist widersprüchlich und lückenhaft und ihre therapeutische Beeinflussung unzureichend.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die pathophysiologischen Hämostasevorgänge bei OLT weitergehend zu untersuchen, um daraus Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung zu erarbeiten.

### 3. ALLGEMEINER MATERIAL- UND METHODENTEIL

#### 3.1. Patienten, operative Bedingungen

Hämostaseparameter wurden bei Patienten (Tabelle 1-8) im Zeitraum von 6/89 bis 1/91 im Endstadium einer Lebererkrankung vor, während und nach ihrer ersten OLT in der Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Virchow-Klinikum, gemessen. Retransplantationen wurden nicht untersucht.

Die OLT wurde nach Standardtechniken unter Verwendung eines veno-venösen Bypasses von V.porta und V.femoralis zur V.axillaris während der anhepatischen Phase durchgeführt (249,250,251).

Zur Kompensation des intraoperativen Blutverlustes wurden Erythrozytenkonzentrate (EK) und frisch gefrorenes Plasma (FFP) gegeben. Angestrebt wurde eine Hämoglobinkonzentration von  $> 10$  g/dl. Generell wurde eine Einheit FFP zusammen mit einer EK Einheit gegeben. Indikationen für FFP und EK Gaben waren ein Abfall der Hämoglobinkonzentration auf Werte unter 9 g/dl bzw. ein Rückgang des Serumalbumins auf Werte unter 3 g/dl und/oder die Verkürzung der partiellen Thromboplastinzeit auf 20 Sekunden und weniger. Patienten mit massivem Aszites zum Zeitpunkt der OLT erhielten gehäuft zusätzliche FFP-Konzentrate, um den vermehrten Proteinverlust während der Laparotomie zu kompensieren. Vor und während der OLT wurden weder Thrombozytenkonzentrate, Frischblutkonserven oder Faktorenkonzentrate transfundiert.

Die Spenderleber wurde während der sog. kalten Ischämiezeit nach Entnahme in einer eisgekühlten Konservierungsflüssigkeit, der UW-CSS Lösung (DuPont, Paris, Frankreich) (Tab.1), aufbewahrt. In ihr erfolgte vor Implantation die Präparation und Spülung der Spenderleber.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der UW-Lösung

Belzer UW-CSS Lösung
Raffinose (30mM)
K-Lactobionat (100 mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (25 mM)
HES (5g%)
MgSO <sub>4</sub>
Adenosin (5mM)
Glutathion (3mM)
Allopurinol (1mM)
Insulin (40 Einheiten)
Penicillin G (200000 Einheiten)
Dexamethason (16mg)

#### 3.2. Probenentnahme (Abb. 3)

Arterielle Blutproben wurden zu 8 bis 10 Zeitpunkten vor, während und nach der OLT entnommen:

- nach Anästhesiebeginn (*Abnahmezeitpunkt 1*) (1)
- 5 Minuten vor Beginn der anhepatischen Phase (2)
- 10 Minuten nach Beginn der anhepatischen Phase (3)
- 5 Minuten vor Reperfusion (4)
- 5 Minuten nach Reperfusion (5)

- 15 Minuten nach Reperfusion (6)
- 60 Minuten nach Reperfusion (7)
- 12 Stunden nach Reperfusion (8)
- 36 Stunden nach Reperfusion (9)
- 60 Stunden nach Reperfusion (10).
- Zusätzlich wurde eine Probe vom Perfusat nach arteriellem Flushing und vor Öffnung der hepatocavalen Anastomose aus der Spenderlebervene gewonnen (P).

Die Blutproben wurden mit 1/10 Volumen Natriumzitrat (0.1 M/l) antikoaguliert. Für die Bestimmung der t-PA Aktivität wurde ein Teil des antikoagulierten Blutes im Verhältnis 1:1 mit Azetatpuffer (0.2 mol/l, pH:3.9) versetzt, um in vitro die Komplexbildung von t-PA mit PAI zu unterdrücken. Zur PAI Bestimmung wurde das Blut in CTAD-Röhrchen (Natriumcitrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol) antikoaguliert, um die Aktivierung der Thrombozyten und damit die Freisetzung von intrathrombozytärem PAI zu verhindern. Die Proben wurden innerhalb von 15 Minuten nach Entnahme bei 3000 U/Minute während 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei -40°C bis -70°C eingefroren. Die Thrombelastographie und die Thrombozytenaggregationsmessungen wurden unmittelbar nach Entnahme (s.u.) durchgeführt.

### 3.3. Bestimmung der Laborparameter

#### 3.3.1. Fibrinolyseparameter

Die Thrombelastographie (TEG) mit rekalkifiziertem Vollblut wurde mit einem Thrombelastographen von Hellige (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Zeichen einer gesteigerten Fibrinolyse wurden mit der WBLT (whole blood clot lysis time (275)) und der MA+45/MA Ratio (s.u.) quantifiziert (Abb.4). Die WBLT ist die Zeit zwischen Maximalamplitude und kompletter Lyse im TEG. Mit ihr kann das Bestehen und der Ausprägungsgrad einer Hyperfibrinolyse bestimmt werden (Abb.4). Wir definierten zusätzlich über den Quotienten aus der Amplitude 45 Minuten nach der Maximalamplitude (MA) und der MA (MA+45/ MA Ratio) einen Parameter, der bei Blutproben mit fehlenden klassischen Hyperfibrinolysezeichen eine gesteigerte Fibrinolysebereitschaft anzeigt (Abb.4). Wir legten fest, daß diese gesteigerte Fibrinolysebereitschaft bei einer MA+45/ MA Ratio von unter 0,95 besteht.

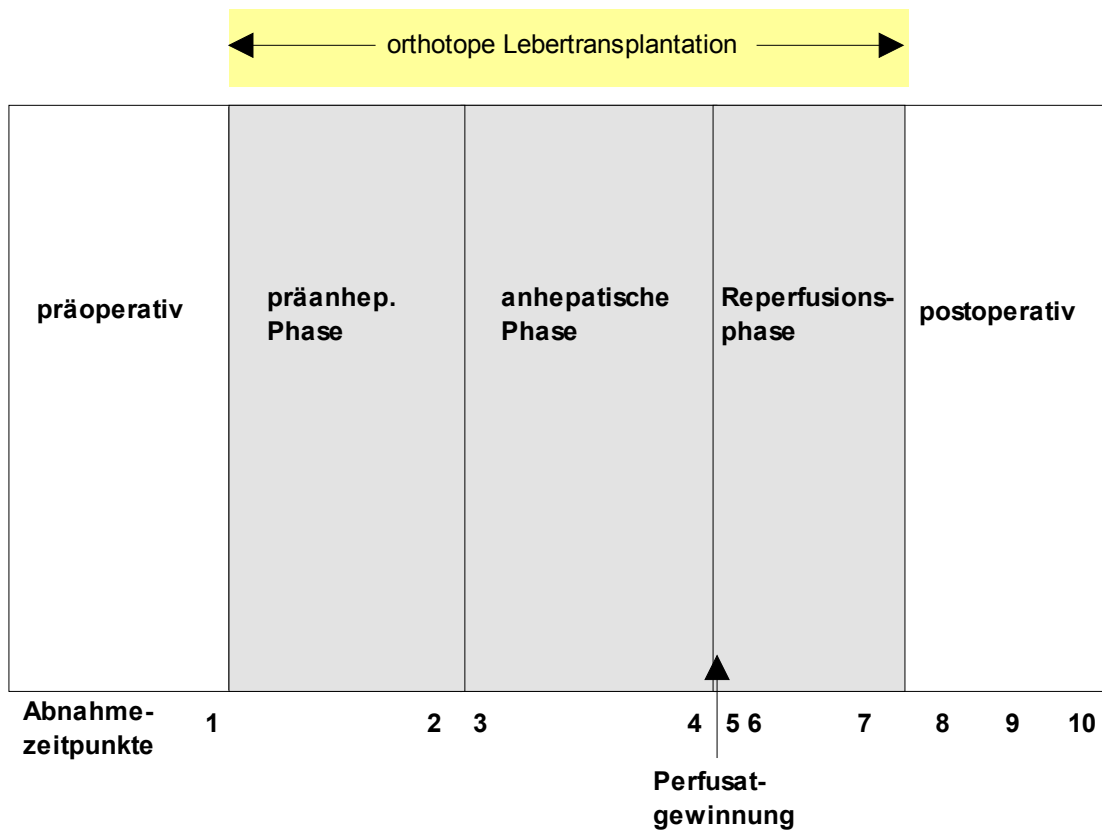
Die folgenden Parameter wurden mit kommerziell erhältlichen Kits bestimmt (vgl.Tab.10):

Die Messung der t-PA Aktivität erfolgte in angesäuerten Plasmaproben durch Messung der amidolytischen Aktivität von Plasmin - durch t-PA Aktivierung aus Plasminogen freigesetzt - gegenüber dem chromogenen Substrat S-2251 (336) (Chromogenix, Stockholm, Schweden). Die Sensitivitätsgrenze lag bei 0.10 IU/ml (Tab.2).

Die PAI (PAI-1) Aktivität wurde nach Zugabe einer bekannten Menge t-PA im Überschuß zu den Plasmaproben bestimmt. Ein Teil dieses t-PA Überschusses wurde durch das vorhandene PAI inaktiviert. Die verbleibende t-PA Menge setzte umgekehrt proportional zur vorhandenen PAI Menge aus Plasminogen Plasmin frei, das entsprechend dem t-PA Aktivitätsassay bestimmt werden konnte (Chromogenix). Die Sensitivitätsgrenze lag bei 5 AU/ml (Tab.10).

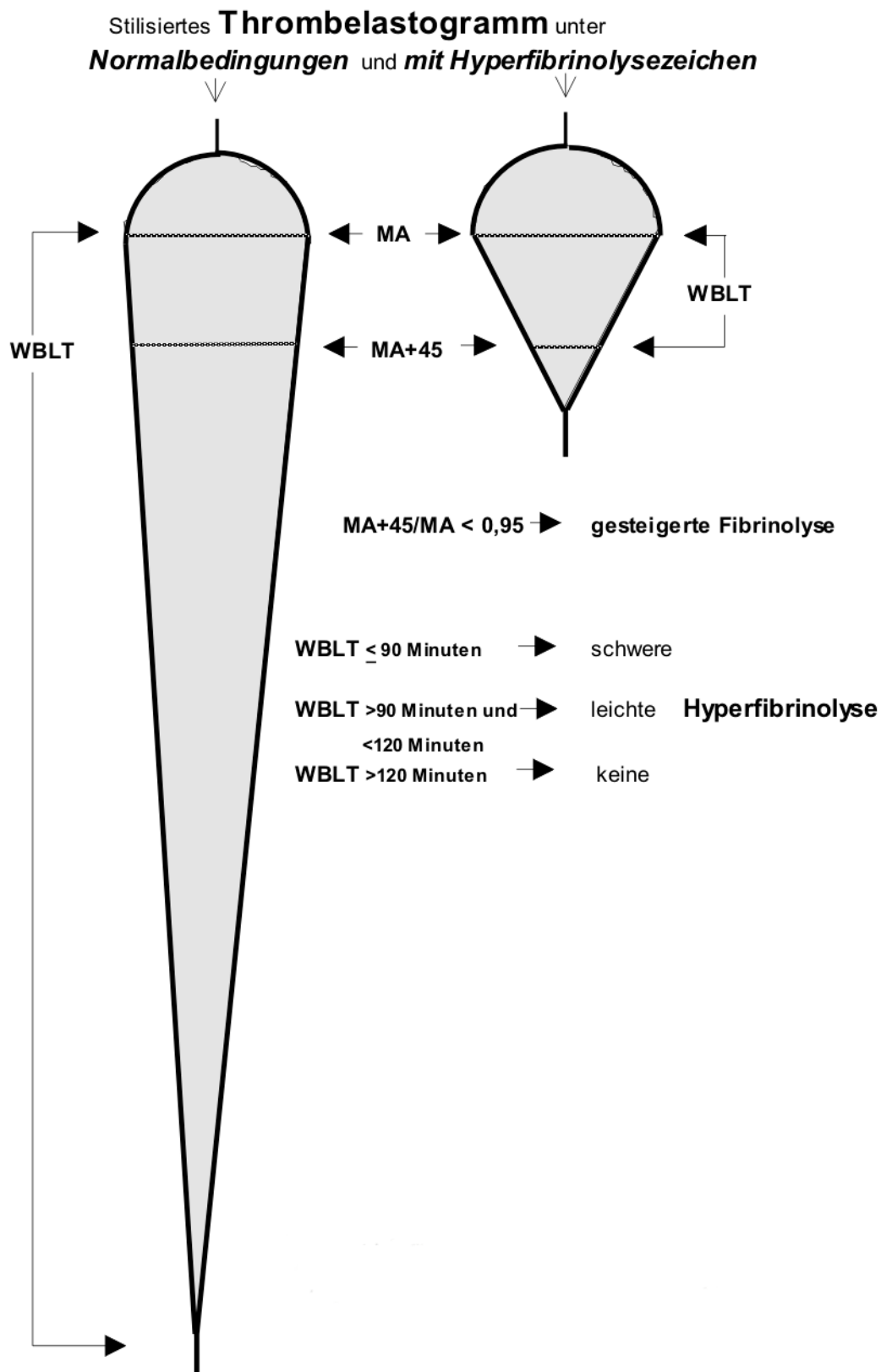
Die t-PA Ag Konzentration wurde in einem ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) mit Hilfe von monoklonalen anti-t-PA Antikörpern mit einer Sensitivitätsgrenze von 0.5 ng/ml gemessen (Chromogenix) (Tab.2).

Ein Immunosorbent-Aktivitätsassay wurde zur kombinierten Bestimmung von aktivierbarer scu-PA und tcu-PA (Biopool, Umea, Schweden) verwendet. Dabei wurde die u-PA Aktivität



**Abbildung 3:** Zeitpunkte der Probenentnahmen und der Perfusatgewinnung





**Abbildung 4:** Parameter zur Auswertung eines Thrombelastogramms:

1. **WBLT:** Vollblutgerinnungszeit
2. **MA+45/MA:** Quotient aus der Amplitude 45 Minuten nach der Maximalamplitude (MA+45) und MA

ebenfalls über Plasminentstehung und dessen Reaktivität mit dem chromogenen Substrat D-But-CHT-Lys-pNA bestimmt. Die Sensitivitätsgrenze lag bei 30 pg/ml (0.004 IU/ml) (Tab.2). Zur Bestimmung der u-PA Ag und scu-PA Konzentrationen wurde ein Enzymimmunoassay verwendet (Biopool), bei dem die Sensitivitätsgrenze bei 1ng/ml Urokinase lag (Tab.2).

Die Referenzwerte (Tab.10) für t-PA, PAI und u-PA Aktivitäten sowie für t-PA und u-PA Ag Werte wurden bei einer Gruppe von 34 gesunden und nüchternen Freiwilligen, denen zwischen 8 und 9 Uhr morgens nach einer Ruhephase von 15 Minuten Blut abgenommen wurde, bestimmt. Die Geschlechtsverteilung dieser Gruppe war ausgewogen (Ratio 50%). Keine der Frauen nahm Kontrazeptiva ein. Das mittlere Alter war 38.1 (Spannweite: 21-76) Jahre.

Die Parameter des u-PA wurden darüberhinaus entsprechend der im Gaubius Institut TNO-IVVO (Leiden, Niederlande) etablierten Methoden gemessen: u-PA Ag wurde durch ELISA, wie zusammenfassend bei Binnema et al. (22,76) beschrieben, bestimmt, jedoch wurden Esel anti-Ziegen IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) anstatt von konjugierten Kaninchen anti-Ziegen IgG verwandt. Der Assay bestimmte u-PA Ag unabhängig von seiner molekularen Konfiguration, d.h. die inaktive Proenzymform scu-PA, die aktive Enzymform tcu-PA und tcu-PA im Komplex mit Inhibitoren. Die durch Plasmin aktivierbare scu-PA Aktivität und die tcu-PA Aktivität wurden mit einem BIA (Bioimmunoassay) gemessen (143), einem Immunoassay wie bereits bei Mahmoud und Gaffney für t-PA beschrieben (222). Im ersten Schritt dieses Assays wurde u-PA durch Kaninchen anti-u-PA IgG immobilisiert. Im folgenden Schritt wurde die Plasminogenaktivatoraktivität mittels des synthetischen Substrates S-2251 (Chromogenix) nach der Methode von Verheijen et al. (336) bestimmt. Die u-PA Aktivität und die Summe aus u-PA und Plasmin-aktivierbarer scu-PA wurden parallel bestimmt, letztere nach einem 30minütigen Aktivierungsschritt mit 1 mU/ml humanen Plasmin. Die Ergebnisse im BIA wurden kalibriert mit scu-PA bzw. u-PA Ag aus humanen Fibroblasten (22). Die untere Sensitivitätsgrenze dieser Assays war 0.2 ng/ml und die Variation innerhalb des Assays betrug 6%, wenn eine Menge von 25µl Plasma im Test verwendet wurde (Tab.2).

Die Bestimmung der PAP Komplexe (Technoclone, Wien, Österreich) wurde mit einem ELISA unter Verwendung monoklonaler Antikörper (116) bestimmt. Die Sensitivitätsgrenze lag bei 1ng/ml (Tab.10). Die Messungen von  $\alpha_2$ -Antiplasmin, C<sub>1</sub>-Inhibitor und Plasminogen (Behring Werke AG, Marburg, Deutschland) erfolgten mit Routinemethoden (Tab.2).

**Tabelle 2:** Bestimmungsmethoden und Normalbereiche der Hämostaseparameter

Parameter (Einheit)	Referenzbereich	Bestimmungsmethode
Plasminogen (%)	65-150	Behring Werke AG, Marburg, Deutschland
t-PA Aktivität (IU/ml) (n=34)*	0,3-2	Chromogenix, Stockholm, Schweden
t-PA Antigen (ng/ml) (n=34)*	1,2-12,5	Chromogenix, Stockholm, Schweden
u-PA Aktivität (ng/ml) (n=34)*	<0,1	Biopool, Umea, Schweden
u-PA Antigen (ng/ml) (n=50)*	1,65-6,24 (Median:3,24)*	Gaubius Institut, Leiden, Niederlande

scu-PA (ng/ml) (n=50)*	1,2-2,95 (Median: 2,10)	Gaubius Institut, Leiden, Niederlande
tcu-PA (ng/ml) (n=50)*	<0,2	Gaubius Institut, Leiden, Niederlande
i-PA (AU) (n=37)*	65-150	Methode nach Himmelreich, Gaubius Institut, Leiden, Niederlande
$\alpha_2$ -Antiplasmin (%)	75-130	Behring Werke AG, Marburg, Deutschland
C <sub>1</sub> -Inhibitor (%)	75-130	Behring Werke AG, Marburg, Deutschland
PAI Aktivität (AU/ml) (n=34)*	0-39	Chromogenix, Stockholm, Schweden
PAP Komplexe (ng/ml) (n=36)*	0-15	Technoclone, Wien, Österreich
Fibrinogen (g/l)	1,6-4	Nach Clauss, Hofmann-LaRoche, Basel, Schweiz
AT III Aktivität (%)	75-130	Behring Werke AG, Marburg, Deutschland
Protein C Aktivität (%)	70-140	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
totales Protein S Antigen (%)	65-150	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
freies Protein S Antigen (%)	70-140	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Fibrinmonomer (0-+++)	0	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
D-Dimere (mg/l)	<0,5	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
TAT Komplexe (mg/ml) (n=34)*	1-4,1	Behring Werke AG, Marburg, Deutschland
F XIII (%)	70-130	Behring Werke AG, Marburg, Deutschland
	70-130	Clot Solubility Assay (166)
vWF Antigen (%)	50-200	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
SThrombomodulin (ng/ml) (n=37)*	0-45	Diagnostica Stago, Asniere, Frankreich
Tumornekrosefaktor (pg/ml)	0-12	Medgenix Diagnostics, Fleurus, Belgien
Neopterin (nmol/l)	0-6	Henning, Berlin, Deutschland
Kathepsin B (mU/l)	0-0,1	Nach Assfalg-Machleidt (6)
IL-6 (pg/ml)	0-12,5	Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
IL-8 (pg/ml)	0-31,2	Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

sL-Selectin (ng/ml)	487,3-1096,3	Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich
sE-Selectin (ng/ml)	23-79,2	Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich
sICAM (ng/ml)	129,9-297,4	Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich
EPI Komplexe (ng/ml)	0-100	E.Merck, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin (KIU)	-	Nach Müller-Esterl (242)

\* an begrenzter Fallzahl bestimmt und deshalb als vorläufiger Normalbereich anzusehen

### 3.3.2. Gerinnungsparameter

Mit kommerziell erhältlichen Kits wurden bestimmt: Aktivitäten des Protein C und des Protein S und die Konzentrationen des vWF Ag, des freien und gebundenen Protein S, der Fibrinmonomere und D-Dimere (Boehringer, Mannheim, Deutschland); AT III Aktivität (Behring Werke AG, Marburg, Deutschland); Fibrinogen nach Clauss (Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz) (Tab.2).

Die F XIII Aktivität wurde mit einer photometrischen Methode (Berichrom F XIII, Behring Werke AG (85)) bestimmt. Parallel wurden die F XIII Aktivitäten in einer 12-titrigen Modifikation des etablierten F XIII Assays (Clot Solubility Assay (166)) gemessen (Tab.2).

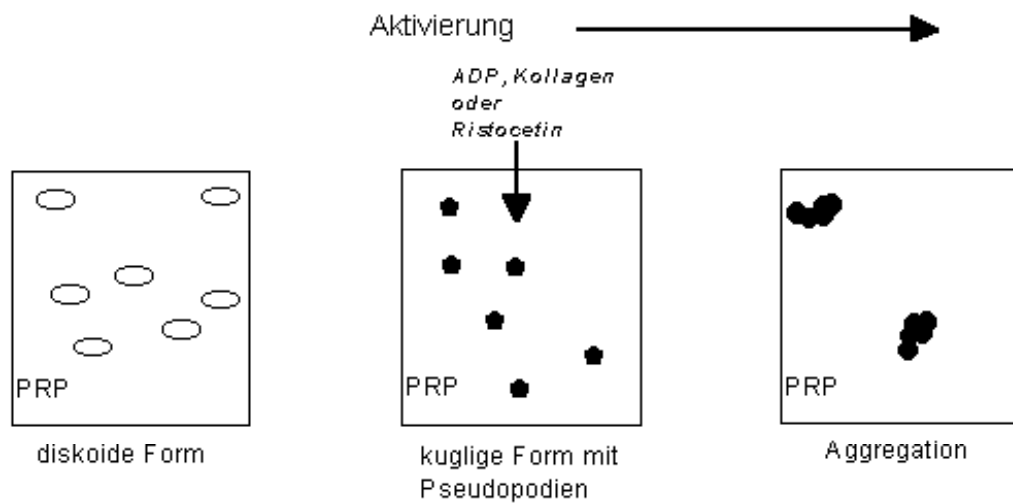
Die TAT Komplexe wurden mit einem ELISA (Behring Werke AG) bestimmt. Die Sensitivitätsgrenze lag bei 0.5 mg/ml und die Referenzwerte (Tab.10) beziehen sich auf die bei 3.3.1. erwähnte Probandengruppe.

### 3.3.3. Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktionsmessung (Abb.5)

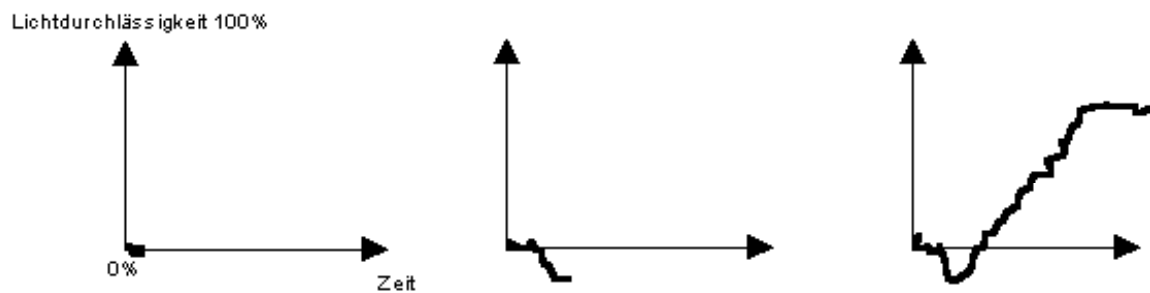
Die Thrombozytenzahl wurde in einem automatischen Thrombozytenzähler (H3, Bayer Technikon, München, Deutschland) bestimmt. Plättchenreiches Plasma wurde durch sechsminütige Zentrifugation bei 600 U/Minute gewonnen. Das nach Abpipetieren verbleibende Blut wurde für weitere 20 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugiert. Auf diese Weise wurde plättchenarmes Plasma gewonnen. Bei in vitro Untersuchungen wurde Gesunden Blut ohne Stauung aus der Kubitalvene entnommen und die Plättchenzahl auf den angestrebten Wert von 200.000/ $\mu$ l eingestellt. Dieses plättchenreiche Plasma mit definierter Plättchenzahl wurde als PRP bezeichnet. Während der OLTs wurde die Plättchenzahl des PRP jeweils durch Verdünnung mit plättchenarmem Plasma oder durch weitere Konzentrierung bei langsamerer Zentrifugation (200 U/Minute) auf die Ausgangsthrombozytenzahl des PRP der ersten Abnahme eingestellt. Dies war wichtig, um unterschiedliche Aggregationskapazitäten bei variierenden Plättchenzahlen zu verhindern. Die Thrombozytenaggregation wurde nach Born (32) durch ein automatisches Thrombozytenaggregationstracersystem (APACT, Labor GmbH, Ahrensburg, Deutschland) (Abb.5a) aufgezeichnet und digital gespeichert. Vor jeder Einzelmessung wurden die Werte für 0% und 100% der maximalen Thrombozytenaggregation mit plättchenarmem Plasma bzw. PRP kalibriert. Die Aggregation wurde induziert durch Kollagen (Endkonzentrationen 0.5 und 1 $\mu$ g/ml), ADP (1 und 2 $\mu$ mol/l), Ristocetin (1.2mg/ml) und Arachidonsäure (500 $\mu$ g/ml). Bei jeder Aggregationskurve wurde

## Messung der Thrombozytenaggregation

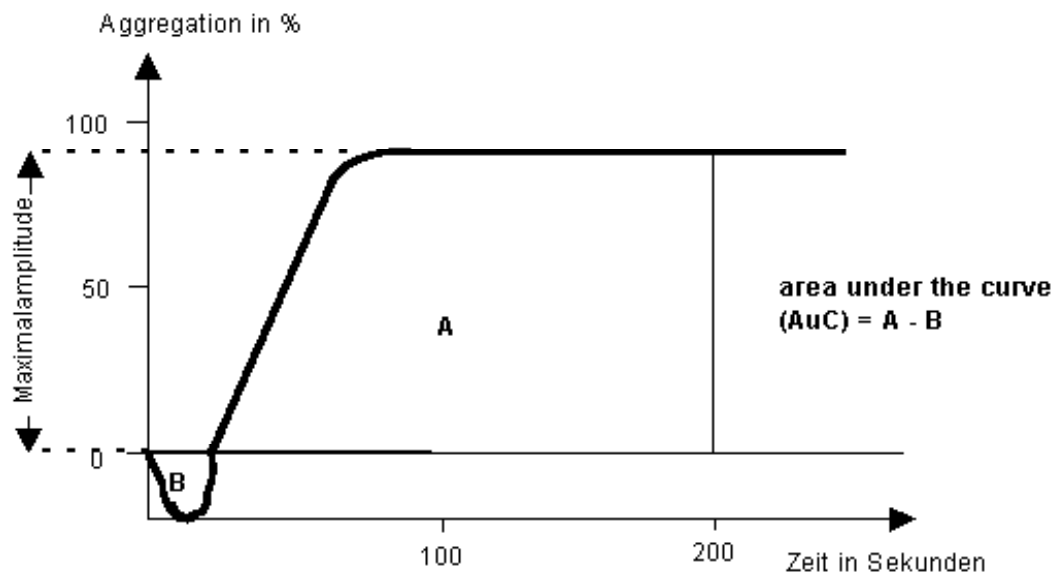
### a) Thrombozytenaggregation ex vivo



### b) Messung



### c) Auswertung



**Abbildung 5:** a) und b) Prinzip der Messung der thrombozytären Aggregationsfähigkeit im Thrombozytenaggregationstracersystem mit plättchenreichem Plasma (PRP) und c) Bestimmung der Maximalamplitude und der Fläche unter der Aggregationskurve (area under the curve (AuC)) bei der Auswertung.

die Maximalamplitude (MA) und die Fläche unter der Aggregationskurve bis 200 Sekunden nach Zugabe der aggregationsauslösenden Substanz (AuC) bestimmt (s.Abb.5a-c). Zusätzlich wurde bei der Kollagen-induzierten Aggregation die Lag-Phase bestimmt, d.h. die Zeit zwischen Zugabe von Kollagen zu PRP und Anstieg der Kurve mit Überschreiten der 0% Linie. Niedrige Plättchenzahlen im PRP beeinflussten die Aggregabilitätsmessungen bei den verschiedenen Agentien in unterschiedlichem Ausmaß (s.5.5.1.1.).

### **3.3.4. Leukozytäre Proteasen, Zytokine und lösliche Adhäsionsmoleküle**

Die Kathepsin B Aktivität wurde mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Phe-Arg-NMec (6) und die Konzentration des Elastase- $\alpha_1$ -Proteaseinhibitors Komplex (EPI; E.Merck, Darmstadt, Deutschland) (252) mit einer Sandwich-ELISA Meßtechnik bestimmt. Der TNF wurde durch den immunoradiometrischen Assay (IRMA, Medgenix Diagnostics, Fleurus, Belgien) und Neopterin durch den Radioimmunassay (Henning, Berlin, Deutschland) gemessen. sE-Selectin, sL-Selectin, s-ICAM (Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich), IL-6 und IL-8 (Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurden mit Sandwich-Elisas bestimmt.

### **3.3.5. sThrombomodulin**

sThrombomodulin wurde mit dem Enzymimmunoassay (152,192) (Diagnostica Stago, Paris, Frankreich) bestimmt (Tab.2).

### **3.3.6. Aprotinin**

Die Aprotininkonzentration wurde mit monoklonalen Antikörpern im ELISA nach der Methode von Müller-Esterl (242) bestimmt.

## **3.4. Statistische Auswertungen**

Mit Hilfe des Martinez und Iglewicz Testes (226) konnte für die Verteilung der meisten Parameter keine Normalverteilung belegt werden. Es wurde deshalb der nicht-parametrische Wilcoxon signed-ranks Test eingesetzt, um Unterschiede verbundener Parameter und der nicht-parametrische Man-Whitney Test, um die Unterschiedlichkeit nicht-verbundener Parameter zu prüfen. Ergebniswerte im Text und in den Abbildungen wurden, soweit nicht anderweitig erwähnt, als Medianwerte mit Spannweiten angegeben. Bei der Evaluation des i-PA Assays (s.5.2.1.) wurden Mittelwert und Standardabweichung benutzt, da Normverteilung nachgewiesen werden konnte. Werte für  $p \leq 0.05$  wurden als signifikant und Werte für  $p \leq 0.01$  als hochsignifikant gewertet.

Die Bestimmung der Verbundenheit zweier Meßreihen wurde mit Hilfe der Korrelationsanalyse berechnet, wobei der empirische Korrelationskoeffizient  $r$  den Grad der linearen Abhängigkeit zwischen beiden Meßreihen angibt. Es wurden dabei nur Korrelationen mit  $r \geq 0,5$  und  $\leq 1$  bzw.  $r \leq -0,5$  und  $\geq -1$  berücksichtigt (Ausnahme 5.2.1.c)). Die Signifikanz der Verbundenheit wurde durch  $p$  bestimmt. Werte für  $p \leq 0.05$  wurden als signifikant und Werte für  $p \leq 0.01$  als hochsignifikant gewertet.

#### 4. UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOPHYSIOLOGIE DER HÄMOSTASESTÖRUNGEN BEI ORTHOTOPER LEBERTRANSPLANTATION

In einer ersten konsekutiven Serie (119, 120) wurden 10 Patienten (Tab.3) im Endstadium einer Lebererkrankung während OLT untersucht. Aprotinin wurde als dreimalige Bolusgabe von jeweils 0.5 Mill. KIU vor Beginn, am Ende der anhepatischen Phase und während der Reperfusionsphase appliziert.

Die Aprotininspiegel zeigten Peaks vor und am Ende der anhepatischen Phase und 60 Minuten nach Reperfusion (Abb.6). Transfusionsbedarf und zeitlicher Ablauf der Operationen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

**Tabelle 3:** Diagnose und Charakteristika von 10 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

Diagnose	Anzahl	Weibl.	männl.	Alter*
Postnekrotische Zirrhose	4	1	3	51(45-64)
Alkoholtoxische Zirrhose	4	3	1	48(39-55)
Budd-Chiari Syndrom	1	1	0	46
Sekundäre biliäre Zirrhose	1	0	1	51
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>49(39-64)</b>

\*Median(Spannbreite) in Jahren

**Tabelle 4:** Transfusionsbedarf intra- und postoperativ, kalte Ischämiezeit, Dauer der Operation, Dauer der anhepatischen Phase und Zeit des stationären Aufenthaltes (Median(Spannbreite))

Zeitraum	EK (Einheiten)	FFP (Einheiten)
Intraoperativ	6,5 (4-26)	7 (1-39)
1. Tag nach Transplantation	1,5 (0-8)	4 (0-15)
1.-3. Tag nach Transplantation	1,5 (0-8)	8 (0-16)
<b>Dauer</b>		
kalte Ischämiezeit	575,5 (330-744) Minuten	
Dauer der Operation	6,5 (5-8) Stunden	
Dauer der anhepatischen Phase	83,5 (73-106) Minuten	
Dauer des stationären Aufenthaltes	25 (19-159) Tage	

**Tabelle 5:** Intraoperativer Transfusionsbedarf (Median (Spannweite) **Gesamtbedarf**) während 5 Lebertransplantationen mit (OLT<sub>Hyperfibrinolyse</sub>) und während 5 Lebertransplantationen ohne (OLT) Hyperfibrinolysezeichen im TEG

Parameter	p(OLT <sub>H</sub> /OLT)	EK (Einheiten) <b>Gesamtbedarf</b>	FFP (Einheiten) <b>Gesamtbedarf</b>
OLT <sub>Hyperfibrinolyse</sub>	n.s.	6 (4-26) <b>50</b>	(0-35) <b>68</b>
OLT	n.s.	5 (5-9) <b>30</b>	6 (5-9) <b>31</b>

#### 4.1. Ergebnisse der Fibrinolyseparameter

Zeichen einer gesteigerten Fibrinolyse waren im TEG ( $MA+45/MA < 0,95$ ) in jeder OLT erkennbar. Drei Patienten zeigten eine schwere ( $WBLT < 90$  Minuten) und zwei Patienten eine milde ( $WBLT > 90$  und  $< 120$  Minuten) Hyperfibrinolyse, die in der anhepatischen bzw. frühen Reperusionsphase begannen.

Präoperativ lagen die t-PA Aktivitäten bei Patienten mit alkoholtoxischer Leberzirrhose höher als in den anderen Diagnosegruppen ( $p < 0,01$ ). Die t-PA Aktivität (Abb.7) stieg in der präanhepatischen und anhepatischen Phase signifikant an mit Kumulation am Ende der anhepatischen Phase, die zu diesem Zeitpunkt hochsignifikant über den Ausgangswerten lag. Der sich im Kurvenverlauf andeutende Abfall fünf Minuten nach Reperfusion ließ sich statistisch nicht sichern. Erst 60 Minuten nach Reperfusion lagen die Werte signifikant unter denen in der anhepatischen Phase. Die t-PA Ag Werte hatten einen ähnlichen Verlauf, jedoch war der Anstieg der Werte während der anhepatischen Phase geringer (Abb.7). Die u-PA Aktivität (Bestimmungsmethode von Biopool, S.3.3.1.) (Abb.8) zeigte in der anhepatischen Phase einen signifikanten Anstieg mit Peak kurz vor und Abfall nach Beginn der Reperfusion. Die u-PA Ag Werte (Biopool) (Abb.8) erreichten erst nach Reperfusion Maximalwerte.

Die PAP Spiegel (Abb.9) stiegen in der anhepatischen Phase signifikant an mit Maximalwerten unmittelbar nach Reperusionsbeginn und nachfolgendem Abfall. Die D-Dimere (Abb.9) waren am Ende der anhepatischen Phase signifikant höher als in der präanhepatischen Phase. Plasminogen (Abb.10) fiel signifikant mit beginnender anhepatischer Phase ab gefolgt von einem tendentiellen Abstieg mit beginnender Reperfusion.

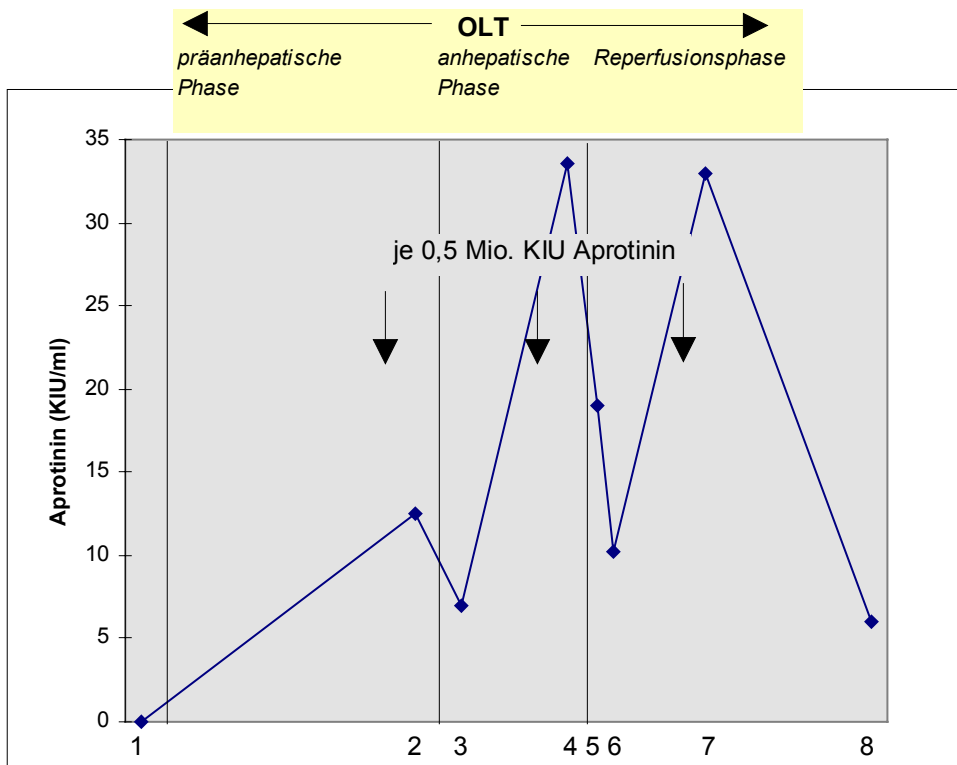
Die Plasmaspiegel der PAI-Aktivität (Abb.10) zeigten nicht-signifikante Schwankungen während präanhepatischer und anhepatischer Phasen. Mit beginnender Reperfusion kam es zum Anstieg der PAI-Werte, die 60 Minuten und 12 Stunden nach Reperfusion deutlich über den Ausgangswerten lagen. Die  $C_1$ -Inhibitoraktivität (Abb.11) fiel unmittelbar nach Reperfusion signifikant ab. Die  $\alpha_2$ -Antiplasminwerte (Abb.11) fielen mit Beginn der anhepatischen Phase signifikant ab gefolgt von einem signifikanten Anstieg am Ende der anhepatischen Phase. Mit beginnender Reperfusion kam es nach signifikantem Abfall zu einem signifikanten Anstieg 15 und 60 Minuten nach Reperusionsbeginn.

Unter Berücksichtigung der Hyperfibrinolysezeichen im TEG lag der Gesamttransfusionsbedarf von EKs bzw. FFPs zahlenmäßig deutlich höher bei den 5 Transplantationen mit Hyperfibrinolysezeichen (Tab.5). Ein Signifikanzniveau konnte jedoch nicht erreicht werden.

#### 4.2. Diskussion der Fibrinolyseparameter

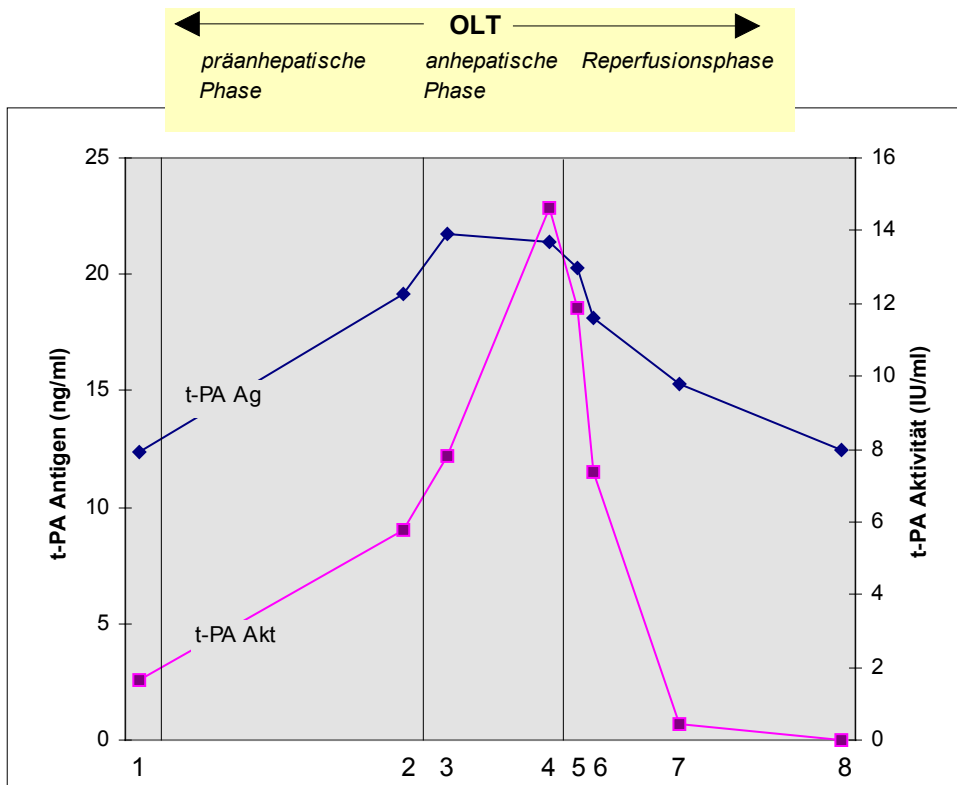
Mehrere Untersuchungen (78,265,275) hatten gezeigt, daß t-PA eine wesentliche Bedeutung in der Genese der gesteigerten Fibrinolyse bei OLT zukommt. Während Porte et al. (275) den entscheidenden Anstieg der t-PA Aktivität erst in der frühen Reperusionsphase beobachteten, sahen andere Autoren t-PA Maximalwerte schon am Ende der anhepatischen Phase (74,263). Porte et al. (275) unterteilten bei 20 OLTs die Patienten mit Hilfe der WBLT in zwei





**Abbildung 6:** Aprotininspiegel im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

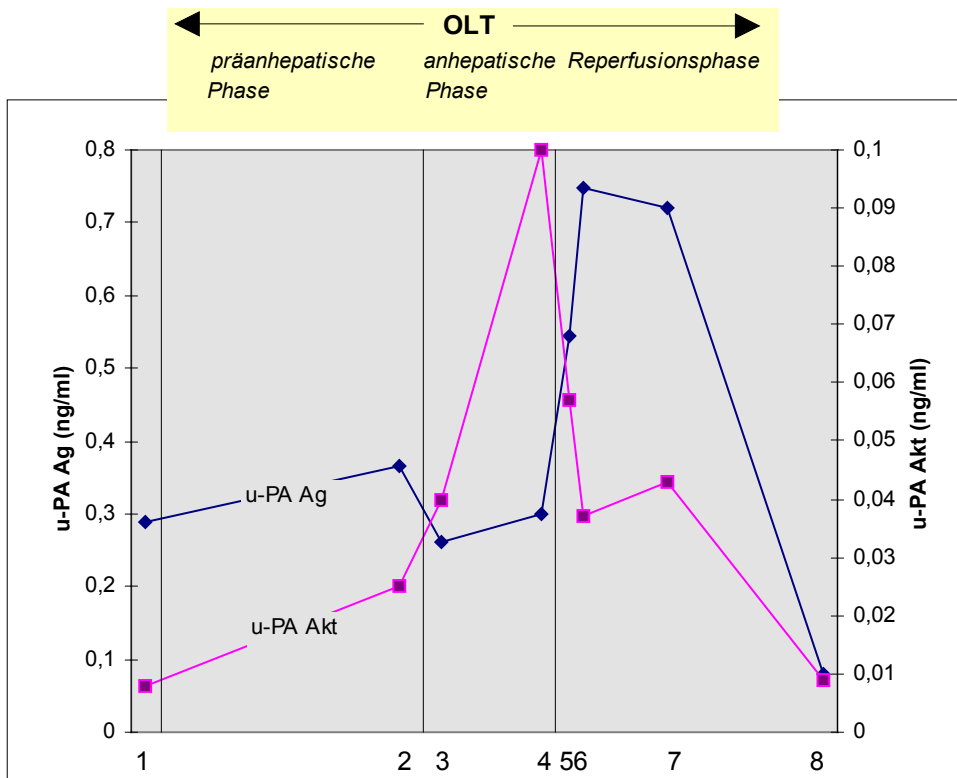
Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
Aprotinin KIU/ml	1-110	2,1-55,2	1,1-59,2	6,4-140,6	2,7-110,1	2-190,7	3,3-282,5	2-97,7



**Abbildung 7:** Verlauf der Werte von t-PA Aktivität (t-PA Akt) und Antigen (t-PA Ag) bei 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
t-PA Ag (ng/ml)	6,2-23,8	10,4-52,3	15,8-72,5	14,3-44,9	12,4-38,5	9-30	6,6-20,6	8,3-19,9
t-PA Akt (IU/ml)	0-7,8	0-22,8	8-27,4	0-30,4	8-142	7-32,6	0-22,8	0-9

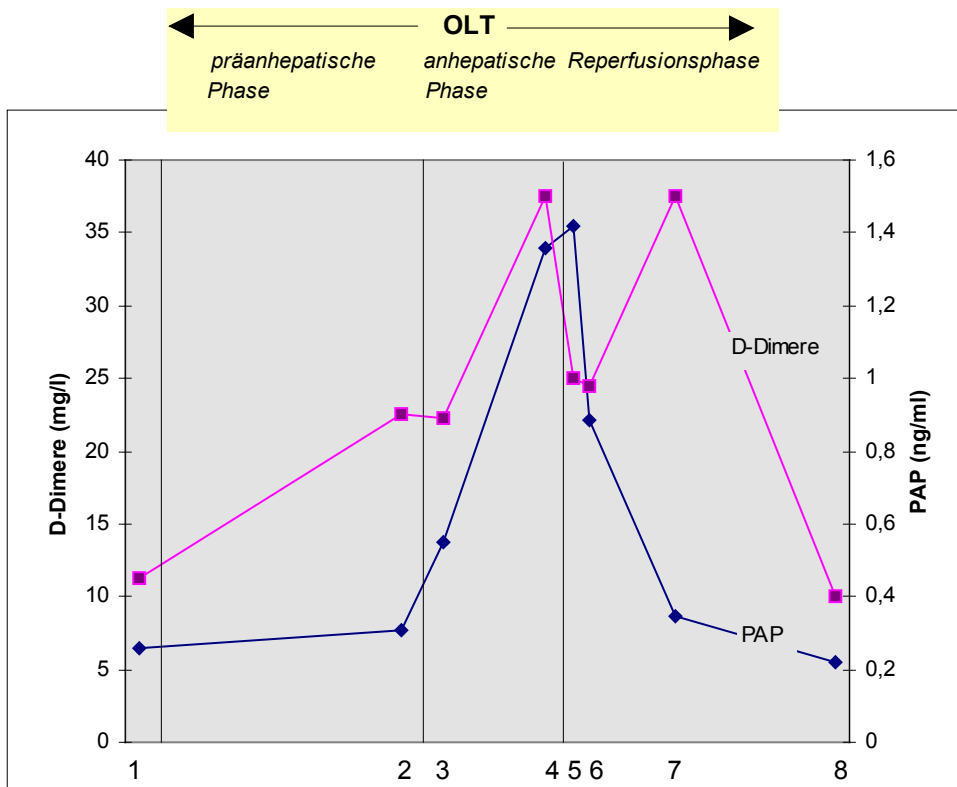
Statistische Signifikanzen					
t-PA Ag	p(1/2) = 0.008	p(1/3) = 0.003	p(1/4) = 0.007	p(1/5) = 0.018	p(4/6) = 0.003
t-PA Akt	p(1/2) = 0.030	p(1/3) = 0.011	p(1/4) = 0.008	p(1/5) = 0.008	p(4/7) = 0.006



**Abbildung 8:** Verlauf der Werte von u-PA Aktivität (u-PA Akt) und u-PA Antigen (u-PA Ag) während 10 orthotoper Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
u-PA Akt (ng/ml)	0-0,08	0-0,3	0-0,15	0-0,52	0-0,27	0,1-0,3	0-0,15	0-0,12
u-PA Ag (ng/ml)	0-1,6	0-3,25	0-6,25	0-3,95	0-5,8	0-6,1	0-6,5	0-3

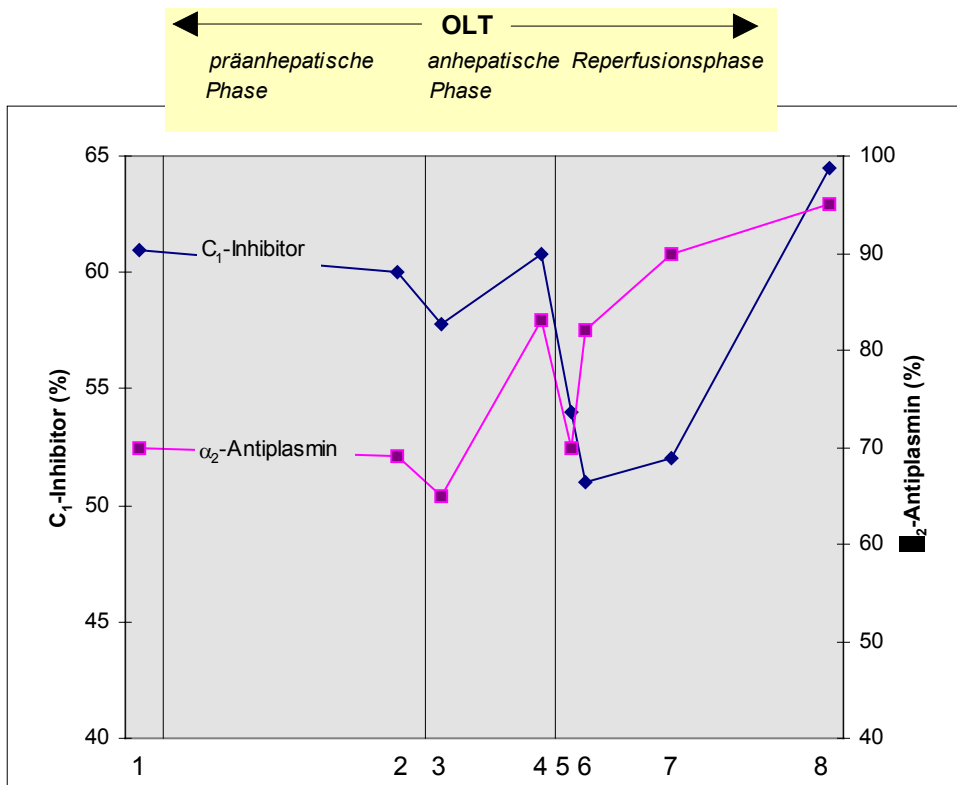
Statistische Signifikanzen						
u-PA Akt	p(1/3) =0.033	p(1/4) =0.009	p(1/5) =0.019	p(1/6) =0.018	p(1/7) =0.014	p(4/5) =0.004
u-PA Ag			p(1/5) =0.046	p(1/6) =0.034		



**Abbildung 9:** Konzentration der Plasmin- $\alpha_2$ -Antiplasminkomplexe (PAP) und der D-Dimere im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
PAP (ng/ml)	8-100	32-1470	30-1840	70-2600	30-1650	30-625	30-705	32-120
D-Dimere (mg/l)	0-16	0-2	0-2	0-4	0-8	48-96	55-114	64-92

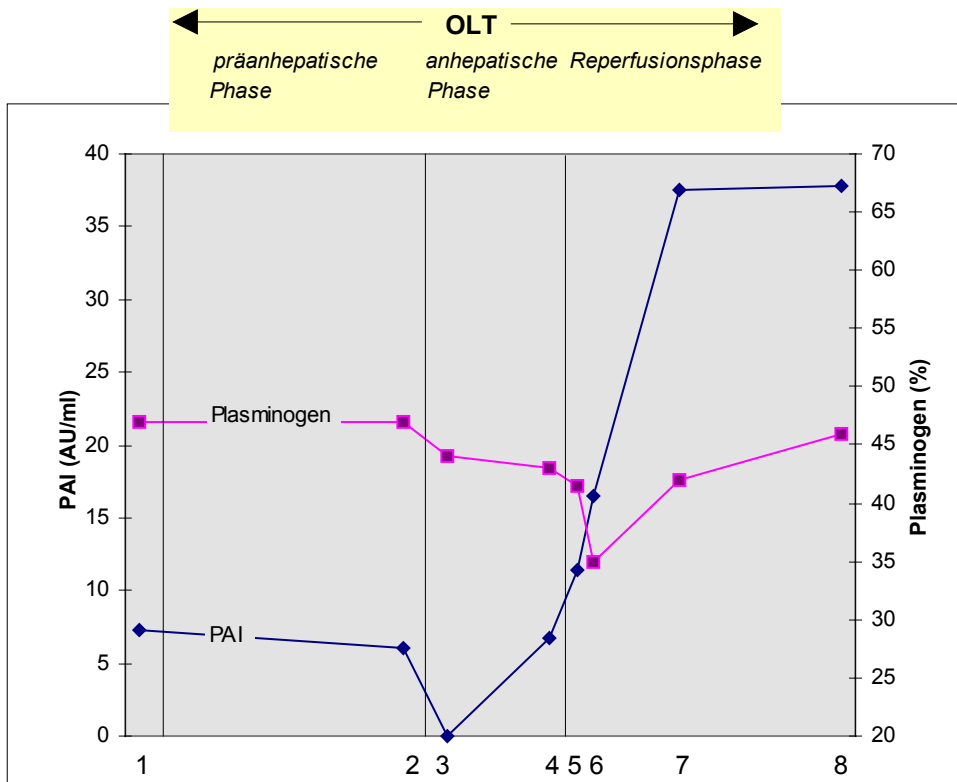
Statistische Signifikanzen		
PAP	p(1/3)=0.04	p(1/4)=0.02
D-Dimere	p(2/4)=0.03	



**Abbildung 10:** Werte von C<sub>1</sub>-Inhibitor und α<sub>2</sub>-Antiplasmin im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
C <sub>1</sub> -Inhibitor (%)	15-135	58-117	48-110	55-107	45-99	48-96	55-114	64-92
α <sub>2</sub> -Antiplasmin (%)	34-116	44-121	38-87	78-110	55-112	60-112	66-128	48-114

Statistische Signifikanzen				
C <sub>1</sub> -Inhibitor			p(4/5)=0.004	
α <sub>2</sub> -Antiplasmin	p(2/3)=0.04	p(3/4)=0.004	p(4/5)=0.008	p(6/7)=0.02



**Abbildung 11:** Verlauf von PAI und Plasminogen bei 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
PAI (AU/ml)	0,3-35,8	0-34,5	0-32,2	0-34,8	0-26,2	0-37,8	6,6-40	0-40
Plasminogen (%)	14-69	30-74	25-68	22-60	30-62	27-61	30-67	28-70

Statistische Signifikanzen		
PAI	p(1/7)=0.008	p(1/8)=0.014
Plasminogen	p(2/3)=0.02	p(4/5)=0.07

Gruppen. Gruppe I (n=7) zeigte minimale und Gruppe II (n=13) schwere Hyperfibrinolysezeichen. In Gruppe II wurde im Anschluß an einen langsamen t-PA Aktivitätsanstieg in der anhepatischen Phase ein explosiver Anstieg postreperfusionell beobachtet. Gruppe I zeigte nur einen verzögerten anhepatischen Anstieg der t-PA Aktivität. Dzik et al. (78) und Palareti et al. (263) konnten bei 8 bzw. 13 Patienten einen Anstieg der t-PA Aktivität in der anhepatischen Phase messen, wobei sich bei Dzik et al. eine direkte Abhängigkeit dieser t-PA Aktivitätssteigerung zum Fibrinolysegrad - gemessen am  $\alpha_2$ -Antiplasminverbrauch und Anstieg der Fibrinogenabbauprodukte - ergab (78).

Bei den vorliegenden Untersuchungen (119,120) konnten schwere und mäßige Hyperfibrinolysezeichen im TEG bei 50% der OLTs mit vorherrschendem anhepatischen Beginn beobachtet werden. Die t-PA und u-PA Aktivitäten zeigten während der präanhepatischen und anhepatischen Phasen einen signifikanten Anstieg mit Maxima am Ende der anhepatischen Phase und Beginn der Reperusionsphase gefolgt von signifikantem Abfall 60 Minuten nach Reperfusion. Das extrinsische fibrinolytische System mit t-PA **und** das intrinsische mit u-PA scheinen somit an der gesteigerten Fibrinolyse während Lebertransplantationen beteiligt zu sein. Parallel zum Aktivitätsanstieg der Plasminogenaktivatoren konnte - als Ausdruck einer gesteigerten Bildung und Wirkung von Plasmin - ein Abfall von Plasminogen und ein Anstieg der PAP Komplexe und D-Dimere gemessen werden. Die Ergebnisse bestätigen die besondere Bedeutung der anhepatischen Phase bei der Entwicklung der Hyperfibrinolyse (78,263).

Der stärkere t-PA Aktivitätsanstieg im Vergleich zum t-PA Ag Anstieg erklärt sich dadurch, daß präoperativ ein Großteil des t-PA Ag in inaktiver - an PAI gebundener und nicht als Aktivität meßbarer - Form vorliegt. Deshalb sind die präoperativen t-PA Aktivitätswerte im Verhältnis niedriger (1.8-fach über dem oberen Referenzwert) als die Antigenwerte (2.5-fach). In der anhepatischen Phase scheint es neben dem t-PA Ag Anstieg gleichzeitig zur Erhöhung des freien t-PA Anteils zu kommen. Dadurch steigt die t-PA Aktivität am Ende der anhepatischen Phase auf das 8.6-fache und die t-PA Ag Konzentration nur auf das 1.7-fache der Ausgangswerte.

Der hochsignifikante PAI-Anstieg in der Reperusionsphase ist zum einen als Reaktion eines Akute-Phase-Proteins zu werten. Zum anderen führen Endothelverletzungen bzw. Endothelzellaktivierung in der Spenderleber mit Revaskularisation zur vermehrten endothelialen Ausschüttung von PAI. Gleichzeitig ist davon auszugehen, daß alterierte Endothelzellen eine gesteigerte Plättchenaktivierung induzieren mit thrombozytärer PAI Freisetzung. Vergleichende Untersuchungen von orthotoper und heterotoper Lebertransplantation - die erkrankte Leber wird im Empfänger belassen und die Transplantatleber in heterotoper Position transplantiert - zeigten einen signifikanten Anstieg der PAI Aktivitäten in der Gruppe der OLT und das Fehlen desselben in der Gruppe der heterotopen Lebertransplantation (12). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der anhepatischen Phase mit Wegfall der hepatischen Clearanceleistung eine entscheidende Bedeutung in der Genese des PAI Anstieges zukommt.

Der Anstieg der  $\alpha_2$ -Antiplasminaktivität in der anhepatischen Phase mit nachfolgendem Abfall und erneutem Anstieg in der Reperusionsphase ist am ehesten als laborchemische Interferenz der  $\alpha_2$ -Antiplasminaktivitätsmessung durch Aprotinin im Assay zu interpretieren. Plasmin, über das im Assay die  $\alpha_2$ -Antiplasminaktivität indirekt bestimmt wird, wird durch

hohe plasmatische Aprotininspiegel (Abb.6) gehemmt. Es werden dadurch erhöhte  $\alpha_2$ -Antiplasminspiegel vorgetäuscht. Der postreperfusionelle Abfall des C<sub>1</sub>-Inhibitors, des Hauptinhibitors der Faktoren des Kontaktsystems, läßt sich durch gesteigerten Verbrauch bei Aktivitätssteigerung vor allem der Kontaktsystem-abhängigen Fibrinolyse erklären.

Hyperfibrinolysezeichen (50% im Vgl. zu 100% bei Porte et al.(275)) und die Maximalwerte der t-PA Aktivität waren in der vorliegenden Untersuchung deutlich niedriger als in früheren Untersuchungen (78,263,275). Ob sich dieses durch die intraoperative Bolusgabe von Aprotinin erklärt, scheint wahrscheinlich, bedarf aber weiterer Untersuchungen. Unter Umständen kommt unterschiedlichen Operationstechniken und Narkosebedingungen sowie dem verminderten Transfusionsbedarf ebenfalls Bedeutung zu. Da die Hyperfibrinolysehäufigkeit bei Porte et al. (275) im Vergleich zu der vorliegenden Untersuchung deutlich höher war und dabei auch ein postreperfusioneller t-PA Anstieg beobachtet wurde, ist es denkbar, daß bei schweren intraoperativen Fibrinolyse mit konsekutiv erhöhtem Transfusionsbedarf ("Massentransfusion") ein zusätzlicher postreperfusioneller Pathomechanismus, z.B. im Sinne einer DIC mit sekundärer Hyperfibrinolyse, eine Bedeutung hat.

#### **4.3. Ergebnisse der Gerinnungsparameter**

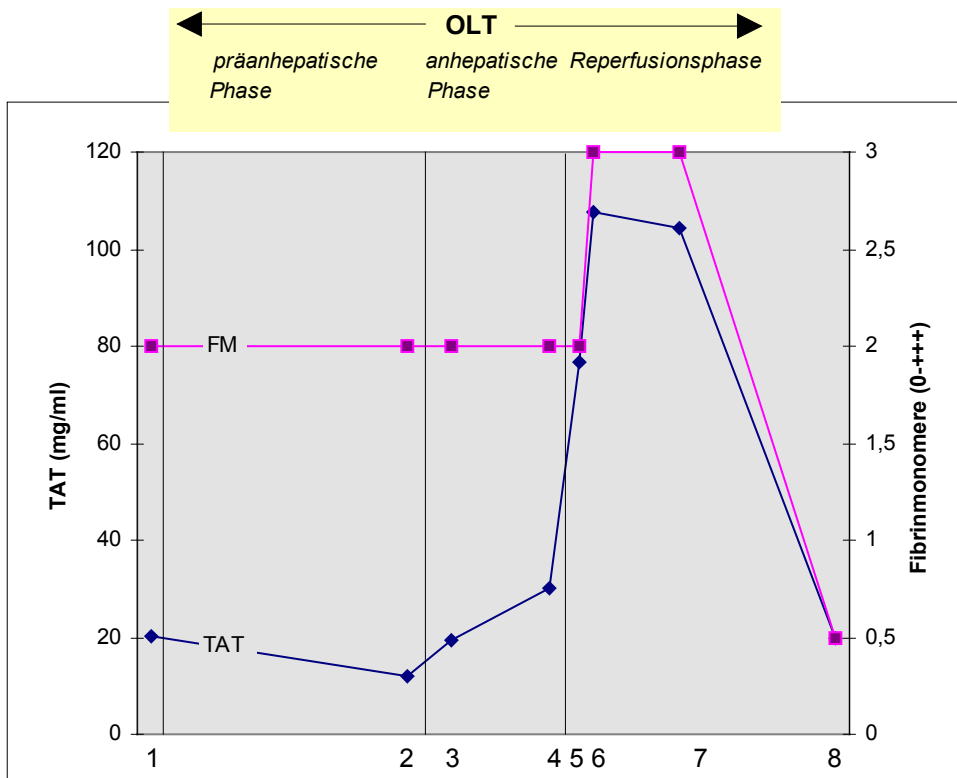
Die TAT Komplexe (Abb.12) stiegen während der anhepatischen Phase kontinuierlich an mit steilem hochsignifikantem Anstieg zu Beginn der Reperfusion. Die Fibrinmonomere (Abb.12) stiegen ebenfalls signifikant nach Reperfusion an. Parallel dazu fielen AT III (Abb.13), vWF Ag (Abb.13), Fibrinogen (Abb.14), freies und gebundenes Protein S Ag (Abb.15) und Protein C (Abb.14) nach Reperfusion signifikant ab. 12 Stunden nach Reperfusion konnte ein signifikanter Anstieg von Protein C und Fibrinogen (Abb.14) mit Werten über dem Ausgangsniveau gemessen werden.

Der Verlauf von freiem und totalem Protein S Ag soll gesondert betrachtet werden (132):

Die präoperativen Konzentrationen von totalem Protein S Ag lagen unterhalb des Referenzbereiches. Beim freien Protein S Ag waren die präoperativen Werte zwar ebenfalls niedrig, sie lagen jedoch noch im Referenzbereich. Bei den Protein S Ag Spiegeln lagen prä-, intra- und postoperativ die Werte von freiem Protein S Ag relativ höher als die Werte von totalem Protein S Ag. Dieser Unterschied erreichte zu allen 8 Abnahmezeitpunkten ein Signifikanzniveau (Abb.15).

Präoperativ lag das Verhältnis zwischen freiem und totalem Protein S Ag bei 7 Patienten oberhalb des Referenzbereichs (Gruppe I) und bei 3 Patienten im unteren Normalbereich bzw. geringfügig darunter (Gruppe II) (Abb.16). Während der OLT lagen bei Gruppe I die Werte von freiem Protein S Ag und totalem Protein S Ag im unteren Bereich des Referenzintervalls und die Werte bei Gruppe II weit unterhalb des Referenzintervalls (Abb.17). Der Vergleich der beiden Gruppen zeigte für das freie Protein S Ag signifikante bzw. tendentielle Unterschiede zwischen beiden Gruppen vor und während OLT während sich keine statistischen Unterschiede für das totale Protein S Ag ergaben. Der postreperfusionelle Abfall beider Formen des Protein S Ag konnte nur in Gruppe I bestätigt werden.

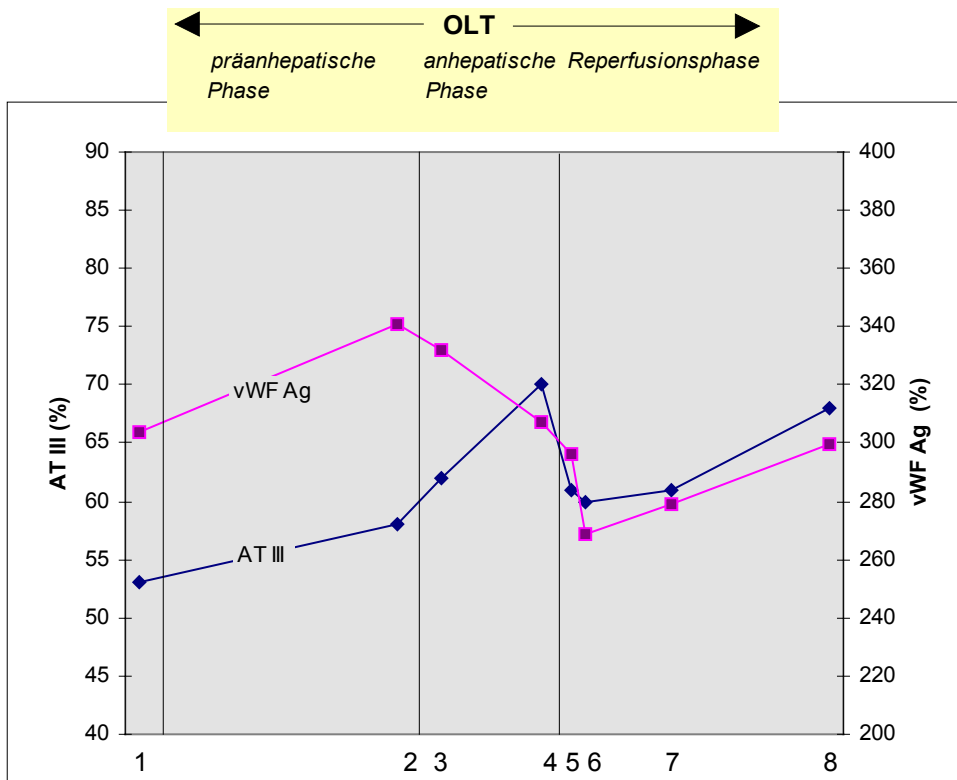




**Abbildung 12:** Konzentrationen von Thrombin-Antithrombin III Komplexen (TAT) und Fibrinmonomeren (FM) im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
TAT(mg/ml)	5,1-39	2,8-57	11,2-58,5	15,7-270	26-216	34-195	35,8-192	7,8-48,5
FM (0-+++)	0-3	0-3	0-3	0-3	1-3	1-3	1-3	0-2

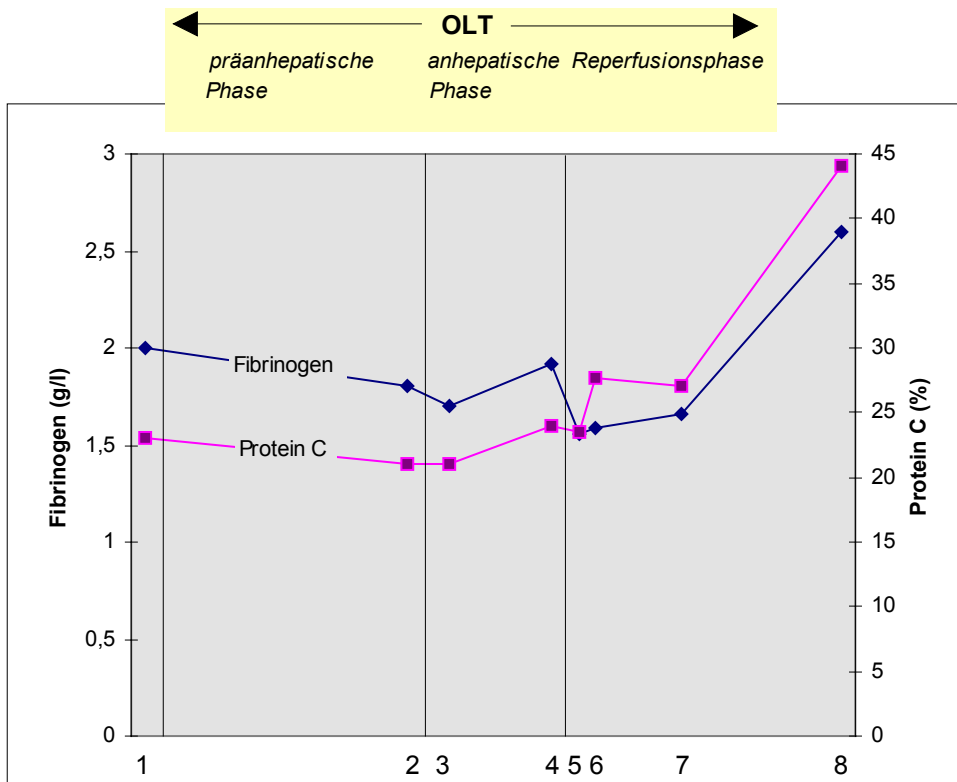
Statistische Signifikanzen		
TAT	p(1/4)=0.025	p(1/5)=0.003
FM		p(1/6)=0.026



**Abbildung 13:** Antithrombin III (AT III) und von Willebrand Faktor Antigen (vWF Ag) im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
AT III (%)	33-80	31-87	40-72	35-89	31-79	42-76	51-75	39-79
vWF Ag (%)	223-453	270-397	257-541	194-405	213-335	187-303	220-358	194-365

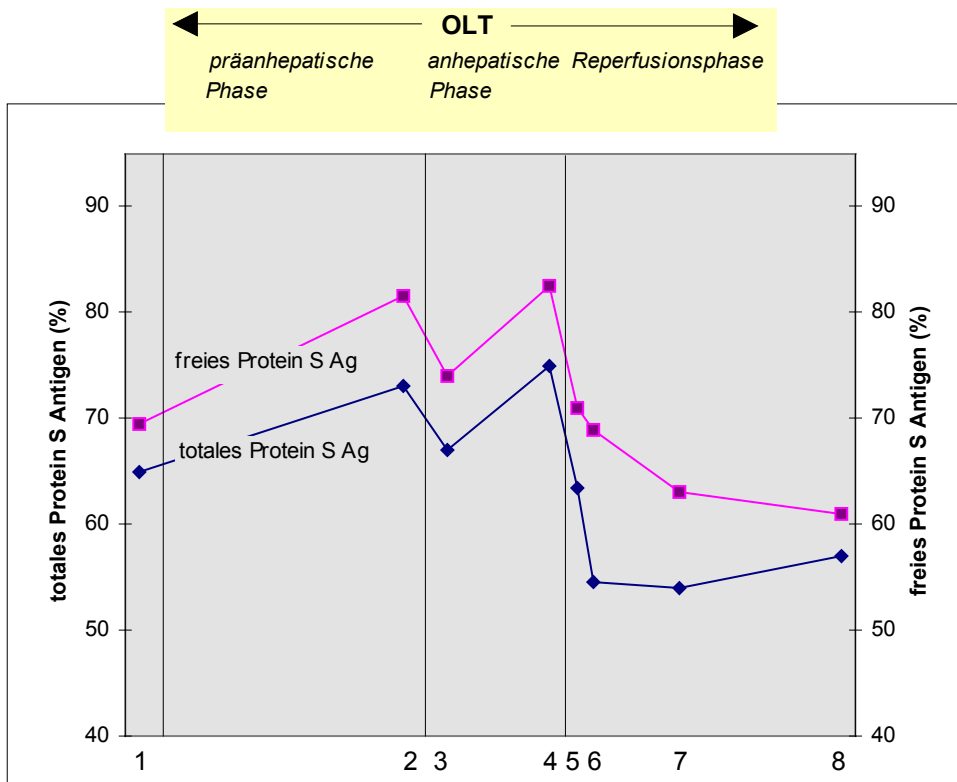
Statistische Signifikanzen	
AT III	p(4/5)=0.008
vWF Ag	p(4/5)=0.04



**Abbildung 14:** Der Verlauf von Fibrinogen und Protein C während 10 orthotoper Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
Fibrinogen (g/l)	0,2-3,4	1,4-3,0	1,2-2,7	1,1-2,7	0,6-2,3	1,1-2,1	1,1-2,5	1,6-3,1
Protein C (%)	7-69	7-60	7-50	9-54	12-39	18-42	17-38	27-83

Statistische Signifikanzen		
Fibrinogen	p(4/5)=0.005	p(1/8)=0.04
Protein C	p(4/5)=0.01	p(1/8)=0.001

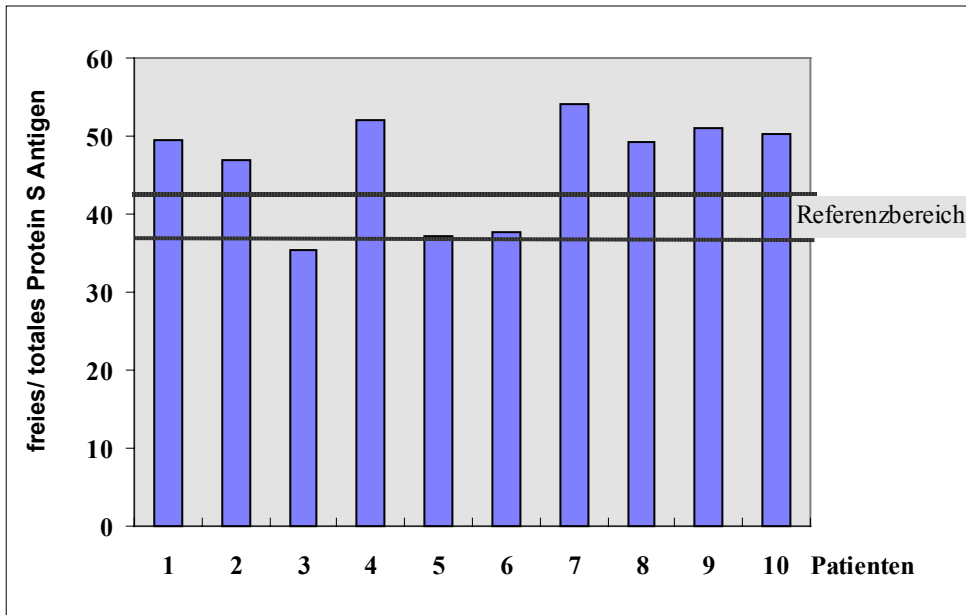


**Abbildung 15:** Freies und totales Protein S Antigen im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

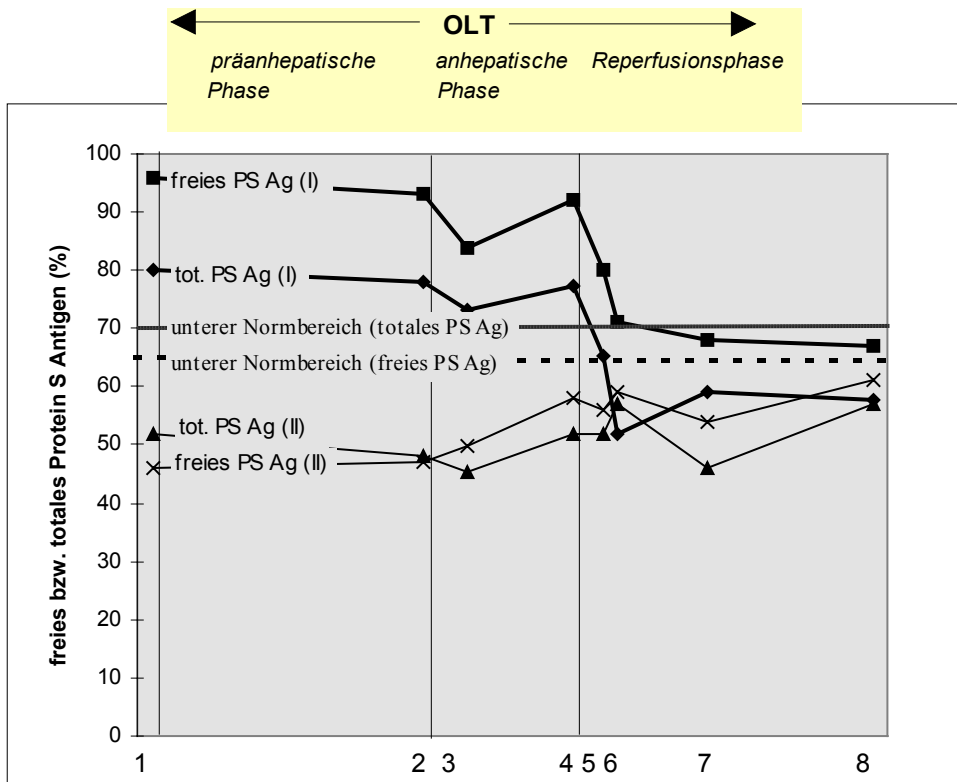
Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
freies Protein S Ag (%)	44-104	46-118	35-118	41-98	38-85	35-98	41-92	43-78
totales Protein S Ag (%)	47-84	40-100	38-110	40-105	34-93	39-84	37-93	36-74

Statistische Signifikanzen	
freies Protein S Ag	p(4/5)=0.002
totales Protein S Ag	p(4/5)=0.005

Statistische Unterschiede zwischen dem Verlauf von freiem und totalem Protein S Antigen bei den Abnahmezeitpunkten 1-8							
p(1)=0.01	p(2)=0.006	p(3)=0.02	p(4)=0.03	p(5)=0.01	p(6)=0.005	p(7)=0.03	p(8)=0.001



**Abbildung 16:** Verhältnis von freiem zu totalem Protein S Antigen (Ag) bei 10 Patienten vor orthotoper Lebertransplantation.



**Abbildung 17:** Verlauf von totalem und freiem Protein S (PS) Antigen (Ag) bei 7 Patienten, deren freie/totale Protein S Ratio erhöht war (Gruppe I) und bei 3 Patienten mit normaler freier/totaler Protein S Ratio (Gruppe II). Die — Linie zeigt den unteren Referenzbereich für totales Protein S Ag und die ..... Linie den unteren Referenzbereich für freies Protein S Ag an.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
totales Protein S Antigen I (%)	47-84	40-100	38-110	40-105	41-93	48-84	42-93	36-74
totales Protein S Antigen II (%)	47-75	48-70	42-61	40-79	34-64	59-63	37-53	55-65
freies Protein S Antigen I (%)	64-104	52-118	47-118	47-98	48-85	55-98	41-92	43-78
freies Protein S Antigen II (%)	44-71	46-75	35-66	41-78	8-70	35-59	48-57	44-74

Statistische Unterschiede zwischen Gruppe I und II									
	p(1)	p(2)	p(3)	p(4)	p(5)	p(6)	p(7)	p(8)	
totales Protein S Antigen I/II	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
freies Protein S Antigen I/II	=0.08	=0.05	=0.06	=0.08	=0.05	=0.05	=0.08	n.s.	

#### 4.4. Diskussion der Gerinnungsparameter

Mit Reperfusion der Spenderleber konnte ein Anstieg der TAT Komplexe gemessen werden (115,275,291). Porte et al. (275) zeigten, daß es nach Reperfusion unabhängig vom Verlauf der t-PA Aktivitäten zum Anstieg der TAT Komplexe kam und interpretierten dies als Ausdruck einer lokalen Gerinnungsaktivierung im Bereich der großen intrahepatischen Wundfläche. Harper et al. (115) untersuchten die Gerinnungsveränderungen während 14 ausgewählter Transplantationen, bei denen der Transfusionsbedarf (EK+FFP) 8,5 Liter/Patient nicht überstieg und die Prothrombinzeit im Normbereich lag. Hier konnte ein rapider Anstieg der TAT-Werte während der anhepatischen Phase und verstärkt nach Revaskularisation der Spenderleber beobachtet werden. Parallel kam es zu einem Abfall der Aktivitätswerte von F V und F VIII. Es wurde daher eine in der anhepatischen Phase beginnende Verbrauchskoagulopathie angenommen. AT III und Fibrinogenwerte zeigten jedoch nur leichte Schwankungen während der Operation. Sato et al. (291) untersuchten das Gerinnungsprofil bei 8 OLTs von denen 4 einer Gruppe mit geringen intraoperativen Blutverlusten (EK-Verbrauch < 10 Einheiten) und 4 einer Gruppe mit hohen intraoperativen Blutverlusten (EK-Verbrauch > 10 Einheiten) zugeordnet wurden. In beiden Gruppen kam es in gleicher Weise postreperfusionell zum Anstieg der TAT Komplexe bei gleichzeitigem Abfall von F V, F VIII und Fibrinogen.

Die vorliegenden Untersuchungen (119,120) zeigten, daß TAT Komplexe und Fibrinmonomere bis zur Reperfusion unverändert blieben, erst dann signifikant anstiegen und noch 12 Stunden nach Reperfusion erhöht waren. In Übereinstimmung damit fielen Fibrinogen, AT III, freies und totales Protein S Ag, Protein C und vWF Ag nach Reperfusion signifikant ab. Bereits 12 Stunden nach Reperfusion konnten signifikante Anstiege von Protein C und Fibrinogen gemessen werden, die als Ausdruck der Leberfunktionsaufnahme anzusehen sind. Diese Ergebnisse sprechen für eine gesteigerte Prothrombinaktivierung beginnend erst **nach** Reperfusion bei gleichzeitigem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Gerinnungsinhibitoren und können im Sinne einer beginnenden DIC interpretiert werden. Diese gesteigerte Gerinnungsaktivierung scheint unabhängig vom Verlauf der t-PA Aktivität (119,120,275) und des intraoperativen Transfusionsbedarfs (291) zu sein. In einer vergleichenden Untersuchung von orthotoper und heterotoper Lebertransplantation konnte in beiden Gruppen eine postreperfusionell gesteigerte Thrombinbildung gemessen werden, sodaß die anhepatische Phase keinen Einfluß darauf zu haben scheint (13). Eine verstärkte Fibrinogenolyse konnte jedoch nur bei OLT bestimmt werden. Es ist nun zu fragen, wie es zu dieser gesteigerten Thrombinaktivierung kommt. Während der kalten Ischämiezeit ist von einer ischämischen Schädigung der Leber auszugehen. Bei Kontakt des Blutes mit alteriertem Endothel kommt es zur Aktivierung und Anlagerung von Thrombozyten und konsekutiv zur Aktivierung des Gerinnungssystems und des fibrinolytischen Systems durch Fremdoberflächenkontakt (38,333). Außerdem führen Gewebeverletzungen über Aktivierung der Leukozyten mit Freisetzung von Zytokinen zur Gerinnungsaktivierung (141,248,282,283,284). Auch die Hepatozyten und das hepatische Monozyten/Makrophagensystem wird während der kalten Ischämiezeit geschädigt. Dieses kann ebenfalls zur vermehrten Freisetzung koagulatorisch wirksamer Proteine führen.

Das erhöhte Verhältnis von freiem zu totalem Protein S Ag bei 7 von 10 Patienten (Gruppe I) zeigte, daß es bei den meisten Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung zu einer

relativen Erhöhung des Anteils an freiem Protein S Ag kommt. Bei diesen 7 Patienten lagen die freien Protein S Ag Werte während der OLT signifikant bzw. tendentiell höher als bei den anderen 3 Patienten (Gruppe II). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß ein präoperativer Mangel des totalen Protein S Ag primär auf einer Abnahme des gebundenen Protein S Ag beruht und damit zur relativen Erhöhung des freien Protein S Ag Anteils führt. Dieses scheint jedoch insbesondere bei Patienten meßbar zu sein, deren Protein S Ag Spiegel noch im Referenzbereich liegen. Erniedrigte Spiegel des C4b-Bindungsproteins im Endstadium einer Lebererkrankung mit relativem Anstieg des freien Protein S Ag könnten dies erklären. Erhöhte Werte des vWF Ag prä- und intraoperativ lassen vermuten, daß endotheliale Freisetzung von Protein S Ag eine Rolle in der auffälligen Verteilung von freiem und totalem Protein S Ag spielen könnte (140). Im Gegensatz zu dem hereditären Protein S Mangel, bei dem entweder beide Protein S Formen oder häufiger nur das freie Protein S Ag als erniedrigt gemessen wird, fanden wir bei Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung vornehmlich einen totalen Protein S Ag Mangel. Klinisch kommt es bei den Patienten mit hereditärem Protein S Mangel zu einer erhöhten Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen, während bei Patienten mit schweren Lebererkrankungen Blutungskomplikationen im Vordergrund stehen, die im Verlauf einer OLT akzelerieren können (140).



## 5. WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOPHYSIOLOGIE DER HÄMOSTASESTÖRUNGEN BEI ORTHOTOPER LEBERTRANSPLANTATION

### 5.1. Einleitung

Die Untersuchungen zur Pathophysiologie der Hämostasestörungen bei OLT (Kapitel 4) lieferten einen interessanten Ersteindruck, der sich zumeist mit den Untersuchungsergebnissen anderer Transplantationszentren deckte. Die pathophysiologischen Gesamtzusammenhänge blieben jedoch in weiten Teilen ungeklärt bzw. spekulativ. Weiterführende Untersuchungen waren daher notwendig. Im folgenden werden zunächst Untersuchungen zum intrinsischen fibrinolytischen System vorgestellt. Die Messungen der u-PA Aktivitäten wurden in Leiden am Gaubius Institut mit der dort entwickelten Methode (s.3.3.1.) durchgeführt. Neben diesem F XII-unabhängigen Plasminogenaktivator kommt jedoch auch dem F XII-abhängigen Plasminogenaktivator klinische Bedeutung zu, sodaß zur Klärung der Bedeutung des gesamten intrinsischen fibrinolytischen Systems (5.2.) seine Bestimmung erforderlich war. Als Methodik stand nur die aufwendige Fibrinplattenmethode zur Verfügung. Es wurde daher eine chromogene Substratmethode entwickelt, die es erlaubte, die Aktivität des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators schnell und auf eine im Routinelabor praktikable Weise zu bestimmen (s.5.2.1.).

Sinnvoll erschien es, die Bedeutung des F XIII, des fibrinstabilisierenden Faktors, zu untersuchen (s.5.3.). Hierfür wurde eine neue Methode etabliert, da der bisher benutzte Clot Solubilitätstest nur eine semiquantitative und zeitaufwendige Messung der F XIII Aktivität erlaubte.

Desweiteren wurde die Bedeutung der Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten für die Hämostase während und nach OLT untersucht. Es wurde der Verlauf leukozytärer Proteasen, Zytokine, Adhäsionsmoleküle und des Endothelzellmarkers Thrombomodulin (s.5.4.) sowie die Thrombozytenfunktion (s.5.5.) untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluß verschiedener Konservierungslösungen auf die Thrombozytenfunktion gemessen.

Abschließend galt es, die Auswirkung der Spenderleber auf die Gesamthämostase - nach Entnahme, kalter Ischämiezeit, Implantation und Flushing - zu untersuchen (s.5.6.). Dieses geschah durch Bestimmung der Hämostaseparameter und der Thrombozytenfunktion systemisch und im Perfusat der Spenderleber.

### 5.2. Bedeutung des intrinsischen fibrinolytischen Systems bei der Entwicklung einer gesteigerten Fibrinolyse während orthotoper Lebertransplantation

#### 5.2.1. Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung der F XII-abhängigen fibrinolytischen Aktivität

##### a) Einleitung

Der Nachweis des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators ist durch die Tatsache erschwert, daß seine Molekularstruktur noch unbekannt ist und daher noch keine spezifischen Antikörper in Testsystemen verwandt werden können. Die Aktivität dieses Plasminogenaktivators kann mit Hilfe von Fibrinplatten bestimmt werden. Die intrinsischen fibrinolytischen Proaktivatoren werden dabei durch Dextransulfat (DS), d.h. durch Kontaktaktivierung, aktiviert. DS bindet die Kontaktfaktoren v.a. F XII, Präkallikrein und HMW Kininogen

(s.Abb.2) an seiner Oberfläche und führt so zur verstärkten Interaktion zwischen ihnen mit konsekutiver Aktivierung. Es entstehen v.a. F XIIa und Kallikrein, die selbst schwache intrinsische Plasminogenaktivatoren sind, deren Hauptaufgabe jedoch in der Aktivierung potenterer Plasminogenaktivatoren liegt. Parallel zur DS Stimulation wird die InhibitorKonzentration reduziert. Dieses geschieht erstens durch Verdünnung der Plasmaprobe (1:10) und zweitens durch isoelektrische Präzipitation bei einem pH von 5.9 (Azetatessigsäure). Bei der isoelektrischen Präzipitation bleiben die meisten Inhibitoren in Lösung (155,157), während die fibrinolytisch aktiven Komponenten präzipitieren und in einem EDTA-Gelatine Puffer (pH 7,8) aufgenommen werden können. Die entstandene Lösung ist eine DS stimulierte Euglobulinfraktion (DEF) nach Kluft (185). DEF wird auf sog. Fibrinplatten in Gegenwart von monoklonalen t-PA und u-PA Antikörpern aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wird die Fläche des aufgelösten Fibrins als Folge der Plasminentstehung gemessen und ausgedrückt als Produkt ( $\text{mm}^2$ ) von zwei aufeinander senkrecht stehenden Durchmessern der kreisrunden Lysezonen (157). Obwohl die Fibrinplattenmethode modifiziert wurde (245), handelt es sich um eine arbeitsintensive und zeitaufwendige Methode. Es wurde eine eigene chromogene Substratmethode entwickelt, die eine schnelle, zuverlässige und wiederholbare Bestimmung der Aktivität des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators ermöglicht. Es wurde nachgewiesen, daß diese Aktivität identisch bzw. in enger Beziehung zu der mit Hilfe von Fibrinplatten ermittelten F XII-abhängigen fibrinolytischen Aktivität steht. Die so gemessene Aktivität wird i-PA (intrinsische Plasminogenaktivator) Aktivität genannt.

#### **b) Prinzip der Methode**

In einer chromogenen Substratmethode wurde die Aktivität von angesäuertem Plasma (AP), das mit DS (MW 1.000.000, Serva, Heidelberg, Deutschland) stimuliert (DSAP) wurde, nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten - mit Hilfe der p-Nitroanillinfreisetzung aus dem chromogenen Substrat S-2251 (Chromogenix, Stockholm, Schweden) - gemessen. Die spektrophotometrische Veränderung der Lichtabsorption pro Stunde (405nm) wurde aufgezeichnet und die Aktivität in Prozent entsprechend einer Standardkurve mit steigender Konzentration von angesäuertem und DS stimuliertem gepooltem Plasma (DSAPP) ermittelt. Als Leerwert wurde angesäuertes Plasma, das mit destilliertem Wasser anstatt DS versetzt wurde ( $\text{H}_2\text{OAP}$  bei Plasma oder  $\text{H}_2\text{OAPP}$  bei gepooltem Plasma), verwendet und der gemessene Wert (meist Null) vom Aktivitätswert des DSAP(P) abgezogen. Die gemessene Aktivität entsprach der i-PA Aktivität.

#### **c) Evaluierung der Methode**

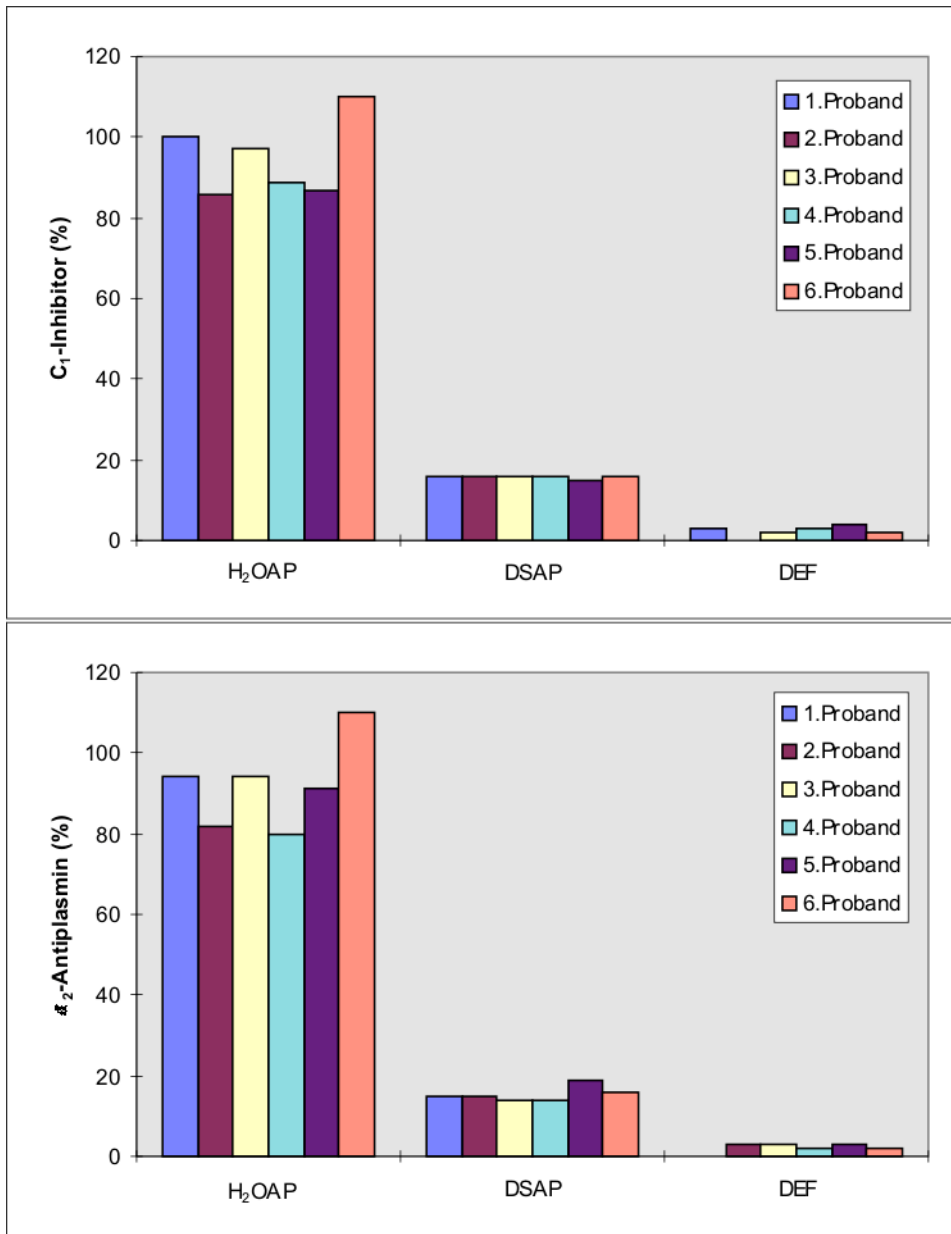
Beim i-PA Assay lag eine 3.5-fache Verdünnung und eine Senkung des pHs auf  $4.4 \pm 0.2$  (Natriumacetatpuffer pH 3.9, 0.2 M) vor.

Es wurde die Aktivität von  $\text{C}_1$ -Inhibitor und  $\alpha_2$ -Antiplasmin in DSAP und DEF der entsprechenden Plasmen bestimmt. Bei DSAP konnte die Inhibitoraktivität bis auf 10% und bei DEF bis auf 1% reduziert gemessen werden (Abb.18).

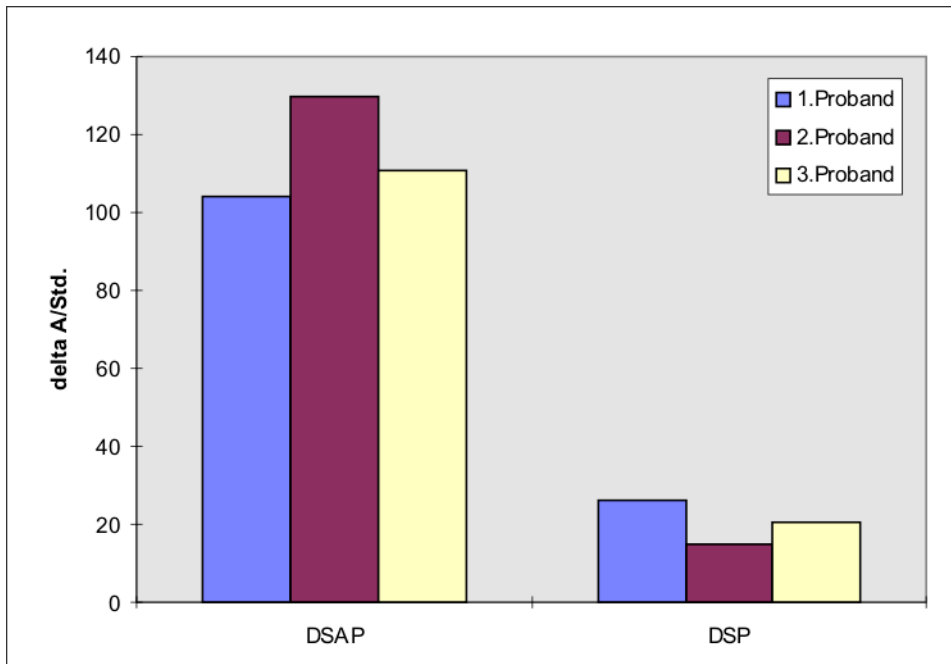
Der Ansäuerungsschritt wurde evaluiert durch Vergleich der Aktivität von DSAP mit DS stimuliertem, jedoch nicht angesäuertem Plasma (DSP) (Abb.19). Die Aktivität von DSAP lag weit über der Aktivität von DSP.

Der Einfluß der Plasmaverdünnung wurde mit Hilfe einer Plasmaverdünnungskurve untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Aktivitätszunahme mit zunehmender Verdünnung trotz Abnahme der Plasmakonzentration (Abb.20). Dieses erklärt sich durch die Abnahme der Inhibitorpotenz mit zunehmender Verdünnung.

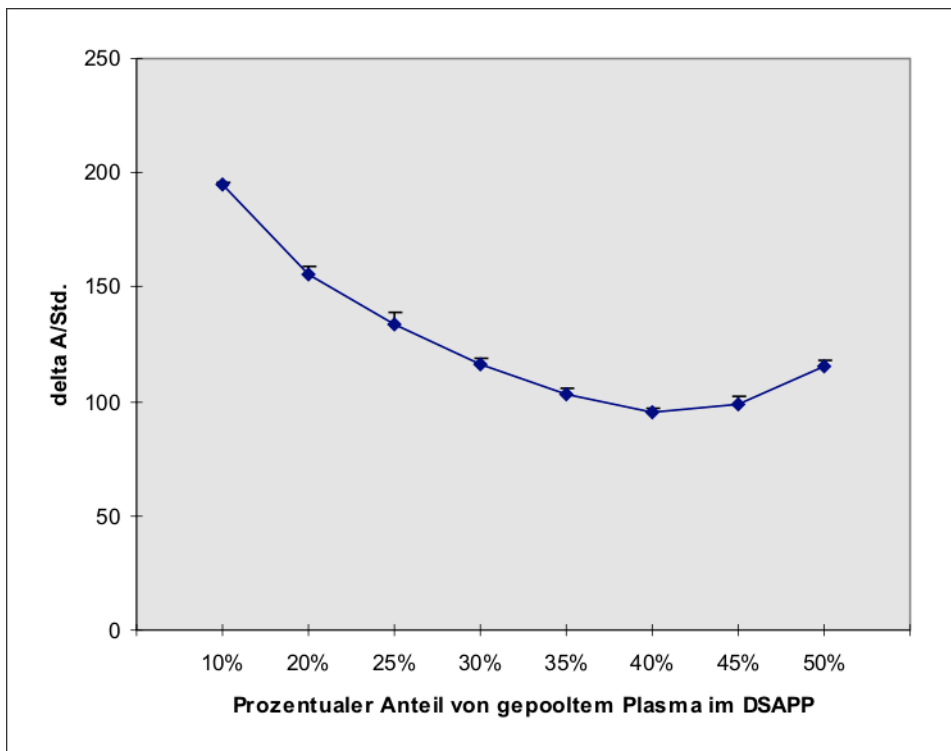
Wir evaluierten den optimalen pH des Tris-Tween Puffers in der Mikrotiterplatte. Es ergaben sich bei pH-Werten zwischen 8.3 und 8.6 lineare Standardkurven. Lag der pH niedriger als 8.3



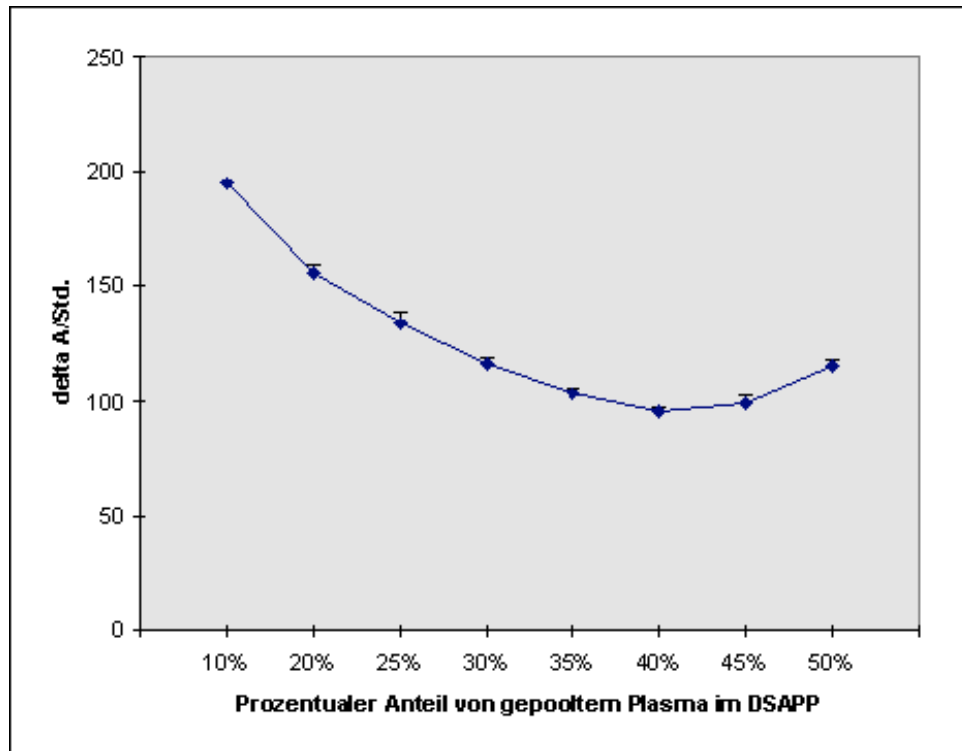
**Abbildung 18:** C<sub>1</sub>-Inhibitor und α<sub>2</sub>-Antiplasmin Aktivitäten in Dextransulfat-stimulierter Euglobulinfraktion (DEF), Dextransulfat-stimulierter und angesäuerten Plasmaproben (DSAP) und nur angesäuerten Plasmaproben (H<sub>2</sub>OAP) bei Verwendung von Plasma 6 gesunder Patienten



**Abbildung 19:** Bestimmung der Aktivität in Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten Plasmaproben (DSAP) und in nur Dextransulfat-stimulierten Plasmaproben (DSP) im i-PA Assay bei Verwendung von Plasma drei Gesunder



**Abbildung 20:** Evaluierung der i-PA Aktivität in gepoolten Dextransulfat-stimulierten Plasmaproben (DSAPP) bei abfallender Plasmaverdünnung (Standardabweichung in der Abbildung).



zeigte sich ein deutliches Sättigungsverhalten gefolgt von einer Reaktionshemmung bei steigenden DSAPP Konzentrationen. Bei einem pH größer als 8.6 konnte ebenfalls ein Sättigungsverhalten jedoch in abgeschwächter Form gesehen werden (Abb.21).

Der Einfluß negativ geladener Polysaccharide wie DS zeigte sich beim Vergleich der Aktivitäten von DSAP und H<sub>2</sub>OAP. Lag keine Stimulation mit DS vor, konnten fast keine Aktivitäten gemessen werden (Abb.22).

Die Evaluierung der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur im i-PA Assay zeigte bei einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur oder 25°C optimale Resultate (Abb.23, 24a,b)). Eine verlängerte Inkubation bis 120 (150 bei 25°C) Minuten war jedoch immer noch vereinbar mit reproduzierbaren Ergebnissen.

Die reaktiven Komponenten des Komplementsystems lassen sich bei hohen Temperaturen schnell inaktivieren (173,228). Ein Teil einer DSAPP wurde im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten inkubiert, während ein Teil parallel bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Aktivitäten beider Teile zeigten vergleichbare Aktivitätswerte (Abb.25). Es konnte somit eine Beteiligung des Komplementsystems bei der i-PA Aktivität weitgehend ausgeschlossen werden.

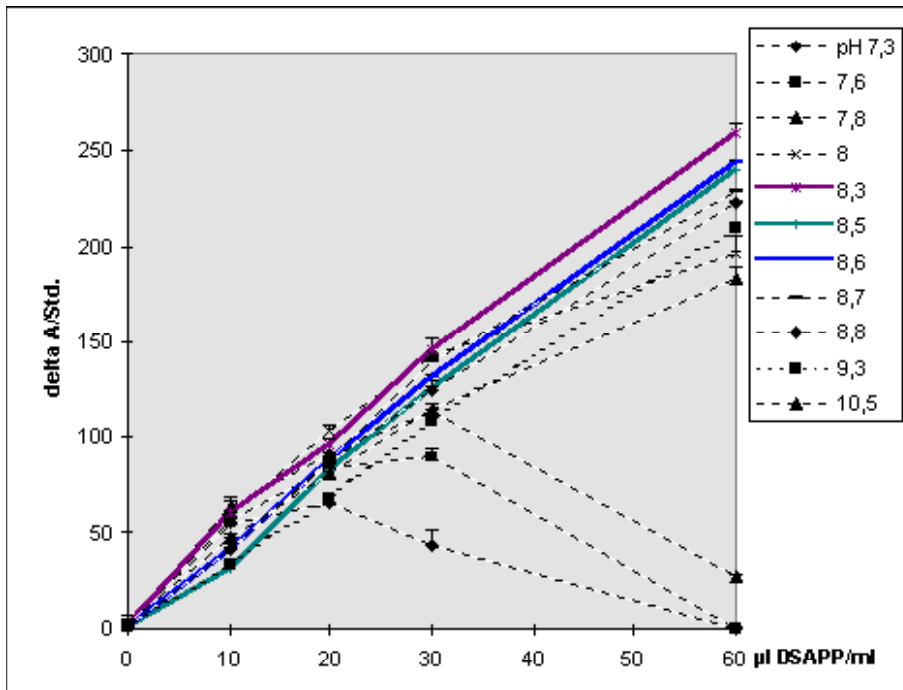
Die Beteiligung der Kontaktfaktoren an der Aktivierung von i-PA wurde untersucht. Es wurde DSAP mit Hilfe von F XI-freiem Plasma (Lot: GK 1104-66, George King Bio Medical, INC, USA) hergestellt. Die gemessene Aktivität im i-PA Assay entsprach der Aktivität von DSAPP (Abb.26). Wurde DSAP mit Hilfe von Hageman Faktor (F XII)-freiem (Lot: GK 1205-914E2, George King Bio Medical, INC) und Fletcher Faktor (Präkallikrein)-freiem (Lot: GK 1703-331D2, George King Bio Medical, INC) Plasma hergestellt, konnte im i-PA Assay keine

Aktivität gemessen werden (Abb.27). Wurde zu Hageman Faktor-freiem Plasma gepooltes Plasma in steigender Konzentration zugesetzt, zeigte sich ein Sättigungsverhalten bezüglich der F XII Zugabe (Abb.28). Bei Mischungen von Fletcher Faktor-freiem Plasma mit gepooltem Plasma wurde ein nahezu linearer Anstieg der i-PA Aktivität mit steigender Konzentration des gepoolten Plasmas erkennbar (Abb.28).

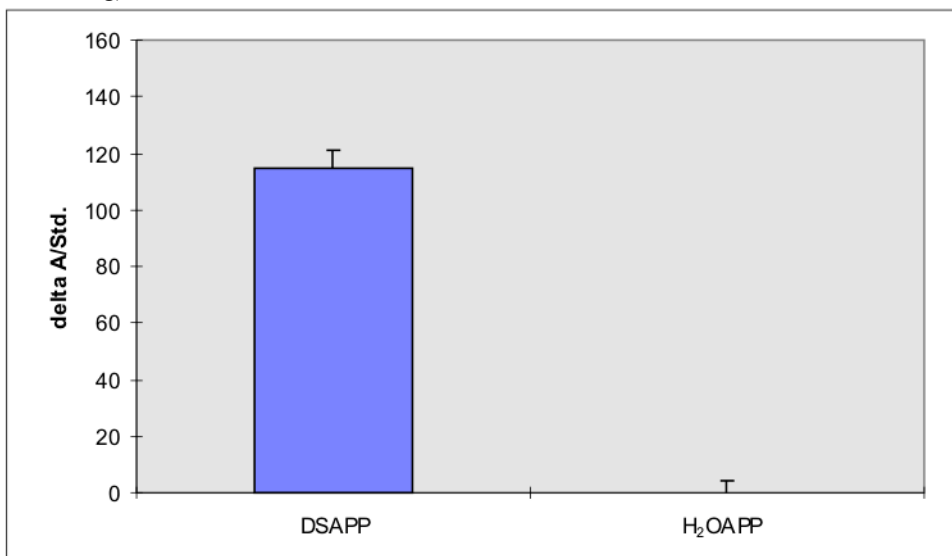
Um zu überprüfen, ob die Kallikreinaktivität mitverantwortlich war bei der im i-PA Assay gemessenen Aktivität, wurde die Kallikreinaktivität in DSAPP nach der von Kluft beschriebenen Methode (182) mit Hilfe des Kallikrein-spezifischen Substrates PKK (Boehringer, Mannheim, Deutschland) gemessen. Steigenden Konzentrationen von DSAPP (2 bis 40  $\mu$ l) wurden 200 $\mu$ l Trisimidazole Puffer ( $\mu$ =0.15; pH 7.9 mit 0.1% Carbowax) und 40 $\mu$ l PKK (1mM in destilliertem Wasser) zugesetzt. Auch bei steigenden DSAPP Konzentrationen war keine Kallikreinaktivität meßbar (Abb.29a). In einem 2.Schritt wurden ansteigende Mengen von reinem Kallikrein dem Testsystem zugefügt. Hier konnte in dosisabhängiger Form die Kallikreinaktivität im Assay wiedergefunden werden (Abb.29b).

Wir bestimmten die Kallikreinaktivität in DSAPP nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von angesäuertem, gepooltem Plasma (APP) mit DS (Abb.30). Es ergab sich ein zweiphasiger Verlauf: Eine zunehmende Kallikreinaktivität war meßbar bei ansteigender Inkubationszeit bis zu einer Inkubationszeit von 10 Minuten gefolgt von einem Abfall der Kallikreinaktivität bei längerer Inkubationszeit (Abb.30).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Kallikrein-freies DEF mit Hilfe einer CNBr-aktivierten Sepharosesäule, die mit monoklonalen Kallikreinantikörpern (Kallikreinantikörper von

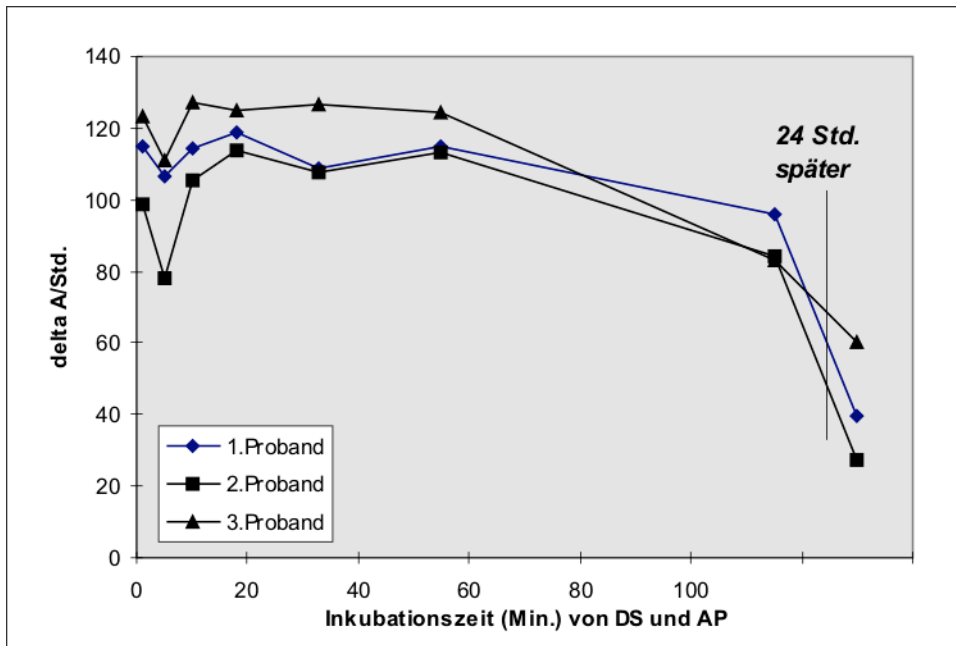


**Abbildung 21:** Prüfung der pH-Abhängigkeit (Tris-Tween Puffer) der i-PA aktivität bei steigenden Konzentrationen von Dextransulfat-stimuliertem und angesäuertem, gepooltem Plasma (DSAPP) (Standardabweichung in der Abbildung)

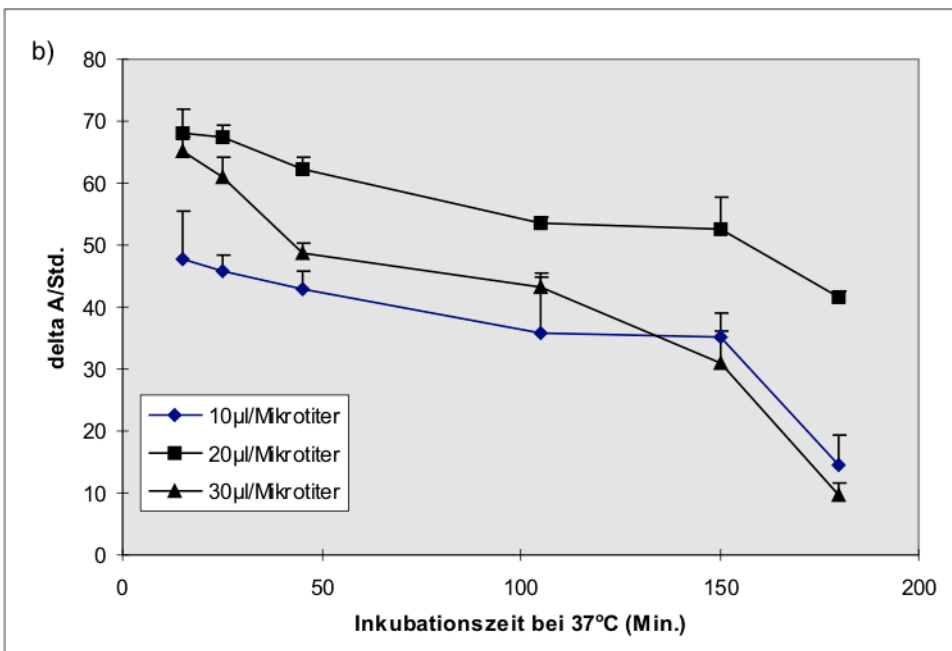
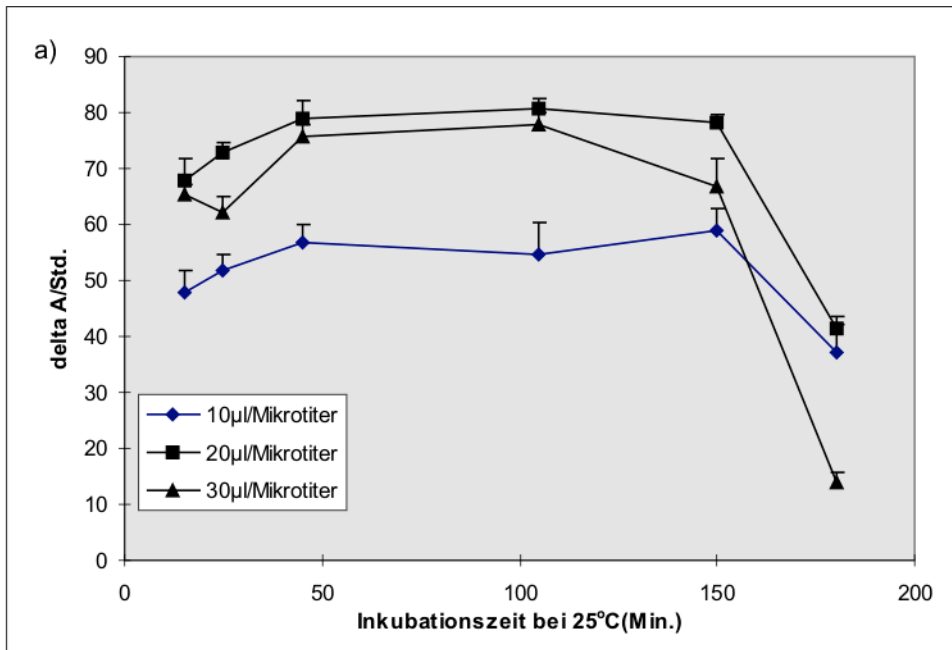


**Abbildung 22:** Bestimmung der Aktivität in Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten, gepoolten Plasmaproben (DSAPP) und in nur angesäuerten, gepoolten Plasmaproben (H<sub>2</sub>OAPP) bei 10 gesunden im i-PA Assay (Standardabweichung in der Abbildung).

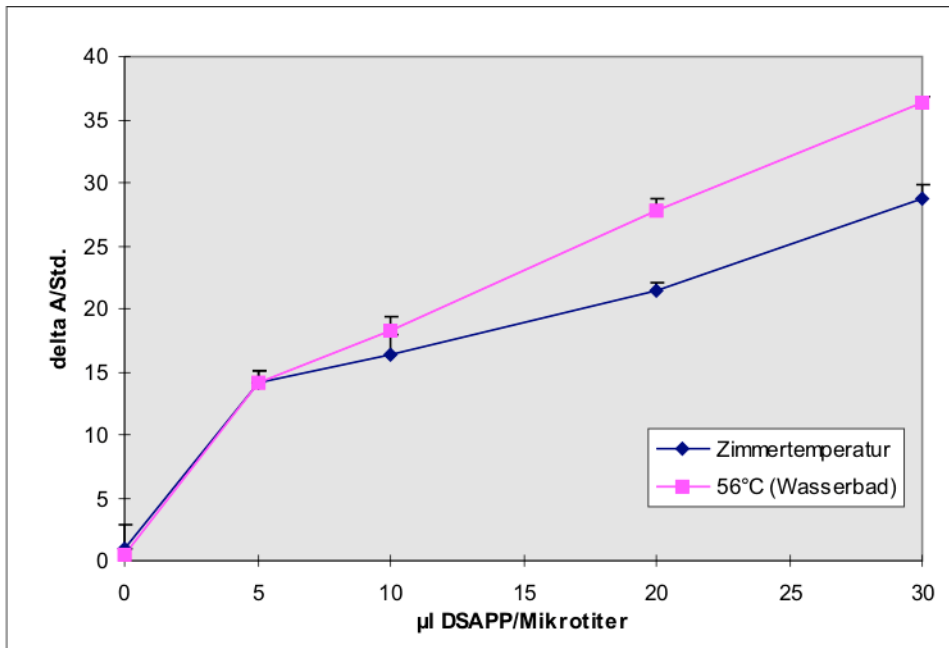




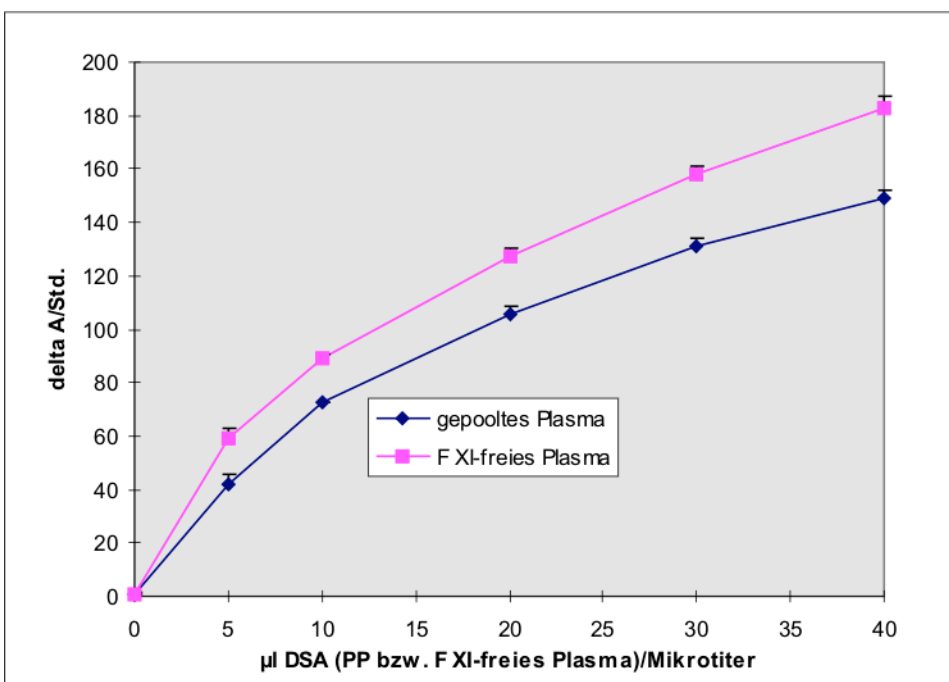
**Abbildung 23:** Evaluierung des Einflusses der Inkubationszeit von Dextran-sulfat (DS) mit angesäuertem Plasma (AP) von 3 Gesunden im i-PA Assay.



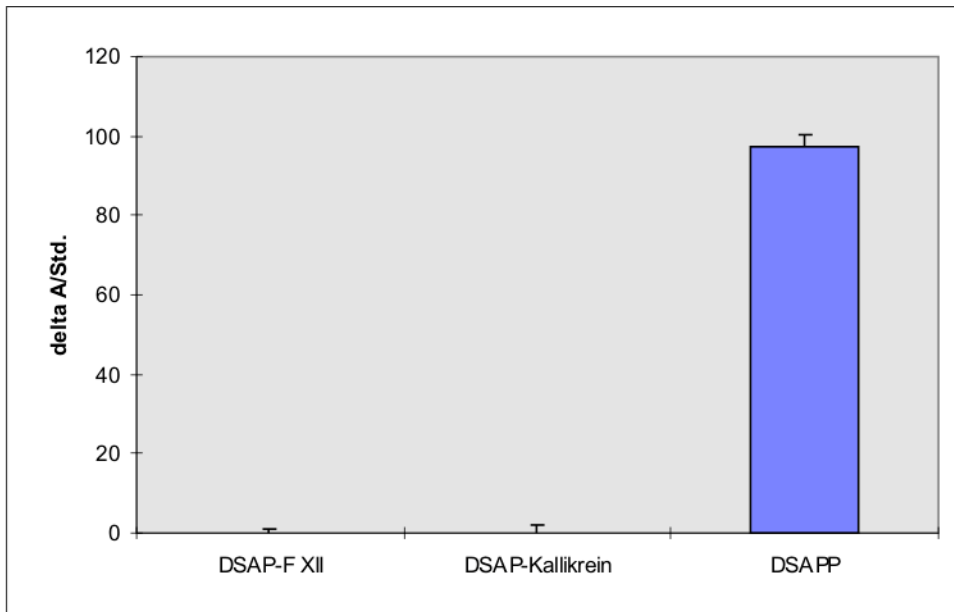
**Abbildung 24:** Evaluation des Einflusses der Inkubationszeit von Dextransulfat mit angesäuertem, gepoetem Plasma bei a) 25°C und b) 37°C im i-PA Assay (Standardabweichungen in den Abbildungen).



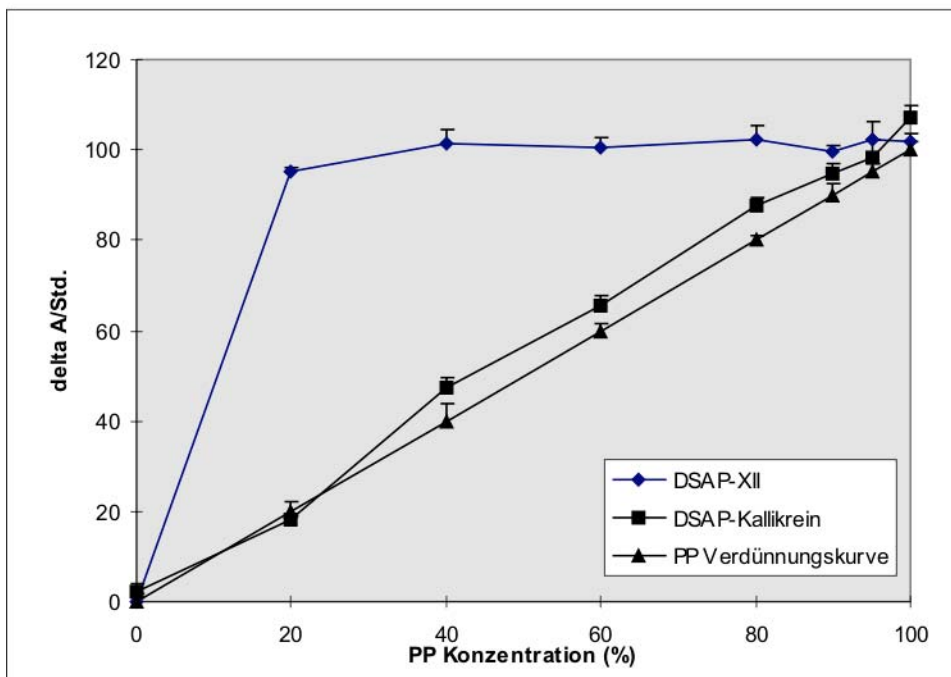
**Abbildung 25:** Wärmeinkubation von Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten, gepoolten Plasmaproben (DSAPP) zum Ausschluß einer Beteiligung des Komplementsystems bei der gemessenden Aktivität im i-PA Assay (Standardabweichung in der Abbildung).



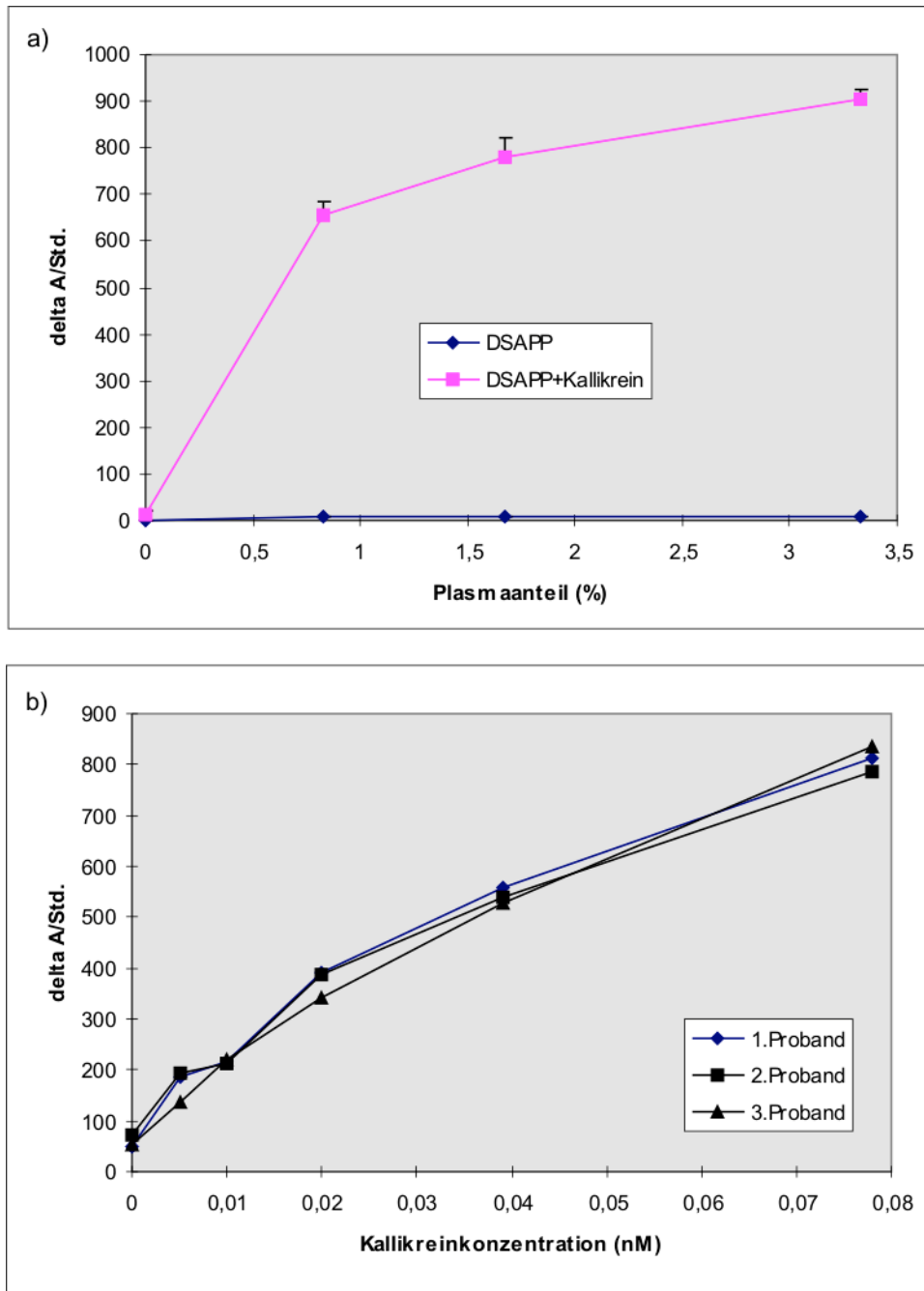
**Abbildung 26:** Aktivitäten in Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten, gepoolten Plasmaproben (DSAPP) und Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten F XI-freien Plasmaproben im i-PA Assay (Standardabweichung in der Abbildung).



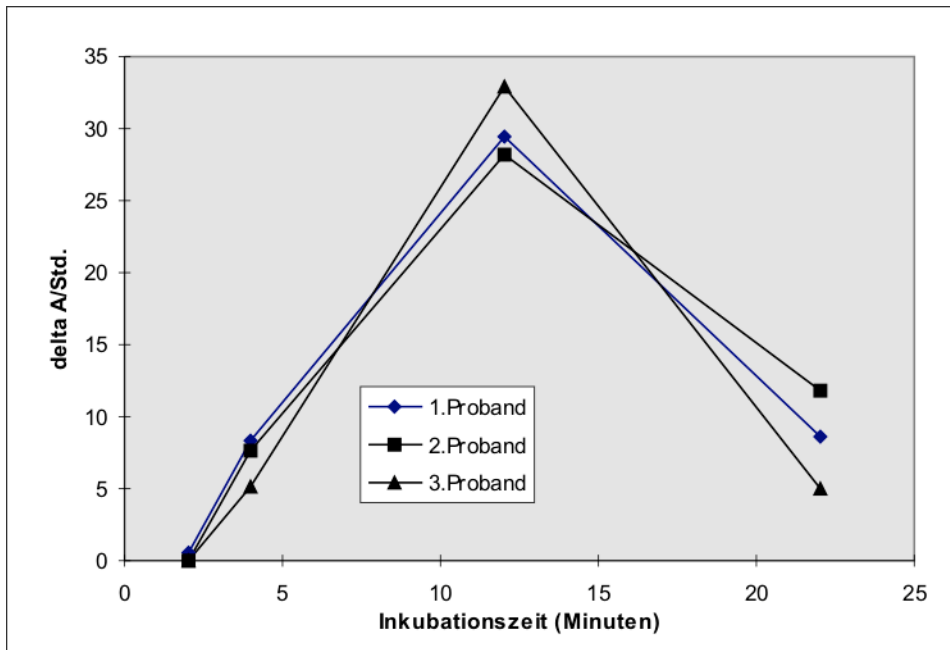
**Abbildung 27:** Aktivitäten in Dextransulfat-stimuliertem und angesäuertem, gepööltem Plasma (DSAPP) und Dextransulfat-stimuliertem und angesäuertem, F-XII- (Hagemann Faktor) (DSAP-FXII) bzw. Kallikrein- (Fletcher Faktor)(DSAP-Kallikrein) freiem Plasma im i-PA Assay (Standardabweichung in der Abbildung).



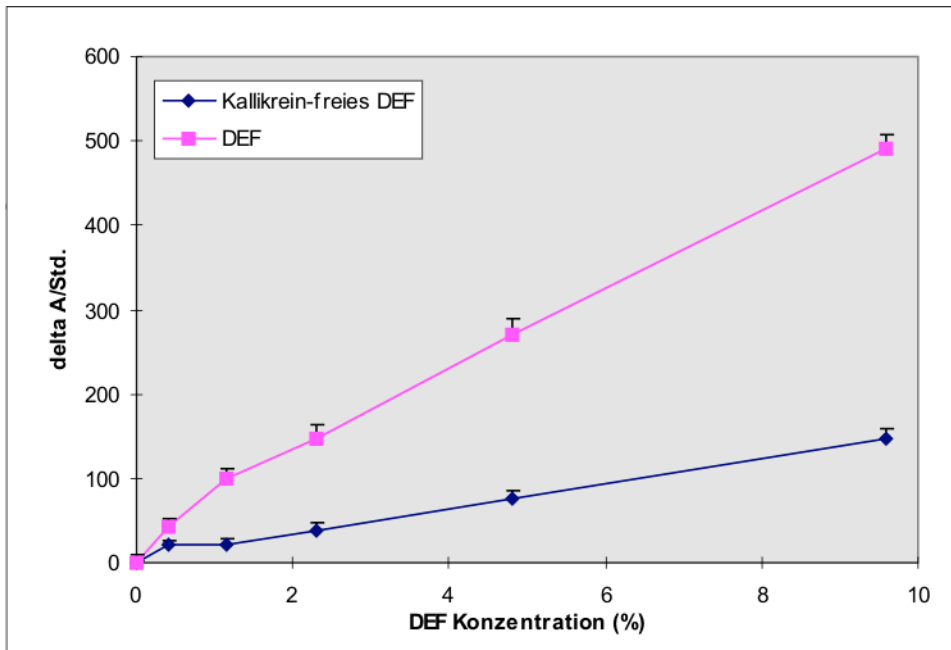
**Abbildung 28:** Aktivitäten von Dextransulfat-stimuliertem, angesäuertem, F XII-bzw. Kallikrein-freiem Plasma (DSAP-XII bzw. DSAP-Kallikrein), bei denen in steigender Konzentration F XII-bzw. Kallikrein-freies Plasma durch gepooltes Plasma (PP) ersetzt wurde. Parallel wurde die Aktivität einer Plasmaverdünnungskurve im i-PA Assay bestimmt (Standardabweichung in der Abbildung).



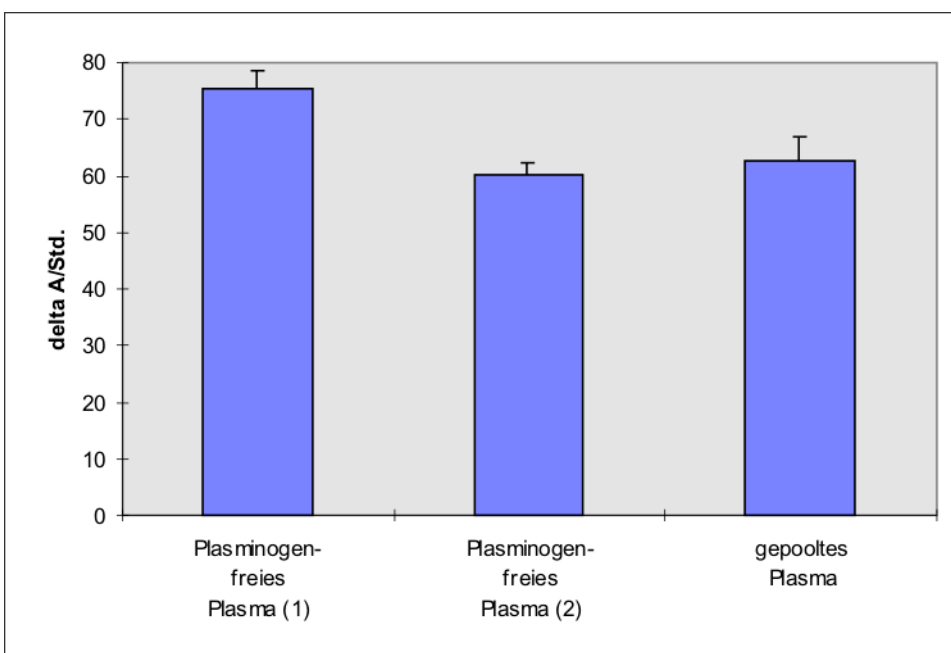
**Abbildung 29:** Kallikreinaktivität gemessen mit dem Kallikrein-spezifischen Substrat PKK bei a) ansteigender Konzentration von Dextransulfat-stimuliertem, angesäuertem, gepooltem Plasma (DSAPP) (Standarabweichung in der Abbildung) und b) gleichbleibender DSAPP Konzentration und ansteigender Kallikreinkonzentration.



**Abbildung 30:** Kallikreinaktivität gemessen mit dem Kallikrein-spezifischen Substrat PKK (Boehringer Mannheim) in Dextransulfat-stimulierten, angesäuerten Plasmaproben von 3 Gesunden.



**Abbildung 31:** Aktivitätsmessung bei steigender Konzentration von Dextransulfatstimulierter Euglobulinfraktion (DEF) und Kallikrein-freier DEF im i-PA Assay (Standardabweichung in der Abbildung).



**Abbildung 32:** Aktivität von Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten Plasmaproben bei der Verwendung von zwei Plasminogen-freien Plasmen und von gepooltem Plasma im i-PA Assay (Standardabweichung in der Abbildung).

Behring Werke Ag, Marburg, Deutschland) beschichtet war, hergestellt. Im i-PA Assay wurde bei Zugabe steigender Konzentrationen von DEF bzw. steigender Konzentrationen von Kallikrein-freier DEF die Aktivität gemessen (Abb.31). Es zeigte sich eine lineare Kurve mit ansteigender Kallikrein-freier und normaler DEF. Die Werte der normalen DEF lagen jedoch höher (30%).

Zusammenfassend ist über die Abhängigkeit der i-PA Aktivität - mit inovativer Methodik bestimmt - von den Faktoren des Kontaktsystems folgendes zu sagen: Die Aktivierung scheint partiell direkt über Kallikrein und nur mittelbar über F XII zu erfolgen, während sie unabhängig vom F XI ist. Diese Ergebnisse bestätigen vorhergehende Untersuchungen, bei denen die F XII-abhängige Plasminogenaktivatoraktivität (77,183) mit der Fibrinplattenmethode bestimmt wurde.

Kallikrein wird im i-PA Assay als nahezu geschwindigkeitsbestimmender Schritt benötigt; dennoch ist die gemessene Aktivität nicht identisch mit Kallikrein. Die Ergebnisse zeigen, daß während der Inkubationszeit Kallikrein gebildet wird - in ansteigender Konzentration während der ersten 10 Minuten - gefolgt von einem schnellen Inaktivierungsprozeß. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten ist daher kein aktives Kallikrein mehr vorhanden. Parallel kommt es zur Bildung von i-PA Aktivität, sodaß ein direkter Aktivierungsmechanismus von i-PA durch Kallikrein angenommen werden kann. Der Inaktivierung von Kallikrein kommt bei Verwendung von DEF keine oder nur geringe Bedeutung zu, denn wird DEF statt DSAP im i-PA Assay verwendet, ist die Kallikreinaktivität für einen wesentlichen Teil der gesamten Aktivität verantwortlich (Abb.31). Die Ergebnisse mit Kallikrein-freiem DEF zeigen jedoch, daß i-PA auch in Abwesenheit von Kallikrein entsteht und mit dem chromogenen Substrat S-2251 reagiert. Die Diskrepanz zwischen der noch zu messenden Kallikreinaktivität in DEF und dem Fehlen der Kallikreinaktivität in DSAPP kann durch das höhere Inhibitorpotential in DSAPP (10%) im Vergleich zu DEF (1%) erklärt werden.

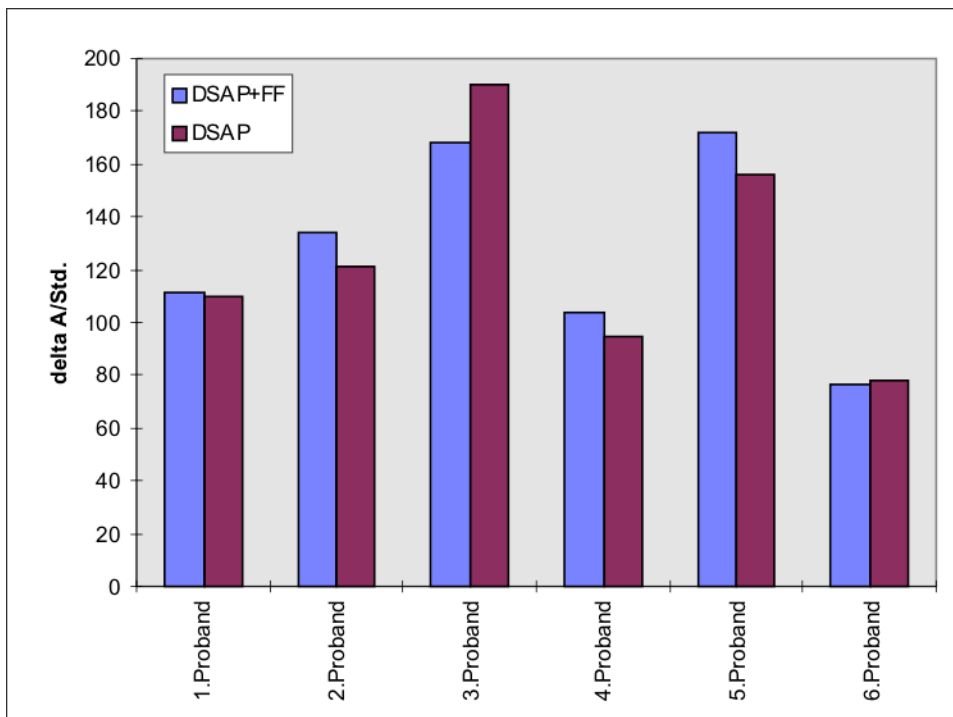
Bei Verwendung von Plasminogen-freiem Plasma zur Herstellung von DSAP zeigte sich eine der DSAPP vergleichbare Aktivität im i-PA Assay (Abb.32). Ebenfalls bestand kein Einfluß von Fibrinfragmenten auf die i-PA Aktivität (Abb.33).

Wurde die i-PA Aktivität in Gegenwart von inaktivierenden t-PA und/oder u-PA Antikörpern gemessen, ergaben sich keine Aktivitätseinbußen (Abb.34). Wurden in einer zweiten Versuchsreihe t-PA (10 IU/ml) oder u-PA (10 IU/ml) dem DSAP zugefügt und die Aktivität bestimmt, konnte die t-PA Aktivität nicht und die u-PA Aktivität reduziert wiedergefunden werden. Es wird daher ein kompletter (t-PA) bzw. partieller (u-PA) Hemmechanismus bzw. Inaktivierungsmechanismus im DSAP gegenüber t-PA und u-PA diskutiert (Abb.35).

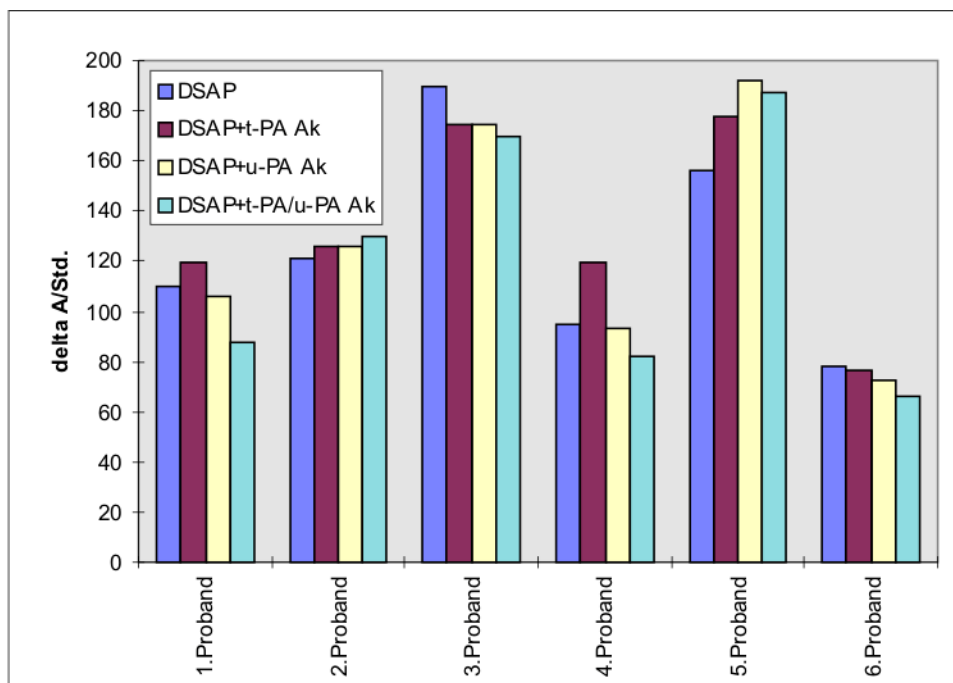
Das Verhalten der i-PA Aktivität auf den Zusatz verschiedener Inhibitoren wurde untersucht und das 50% Inhibitorprofil erstellt (Tab.12) (92,277,347).

Das 50% Inhibitorprofil zeigte, daß es sich bei i-PA um eine Trypsin-ähnliche Serinprotease handelt, die aber weder mit Trypsin noch mit F XIIa identisch war. Die äquivalente Inhibitor dosis von PKSI-527 (347) gegenüber der F XII-abhängigen fibrinolytischen Aktivität in der Fibrinplattenmethode (C.Kluft, Gaubius Institut, Leiden, Niederlande, persönliche Mitteilung) und gegenüber der i-PA Aktivität im i-PA Assay, bestätigten die enge Beziehung beider Aktivitäten bzw. machten ihre Identität wahrscheinlich.

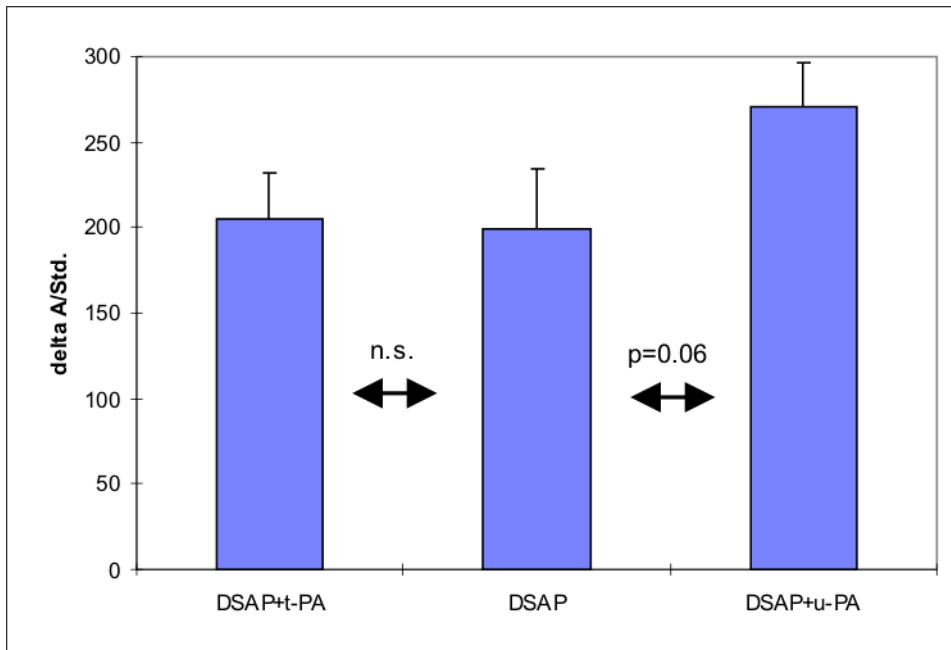




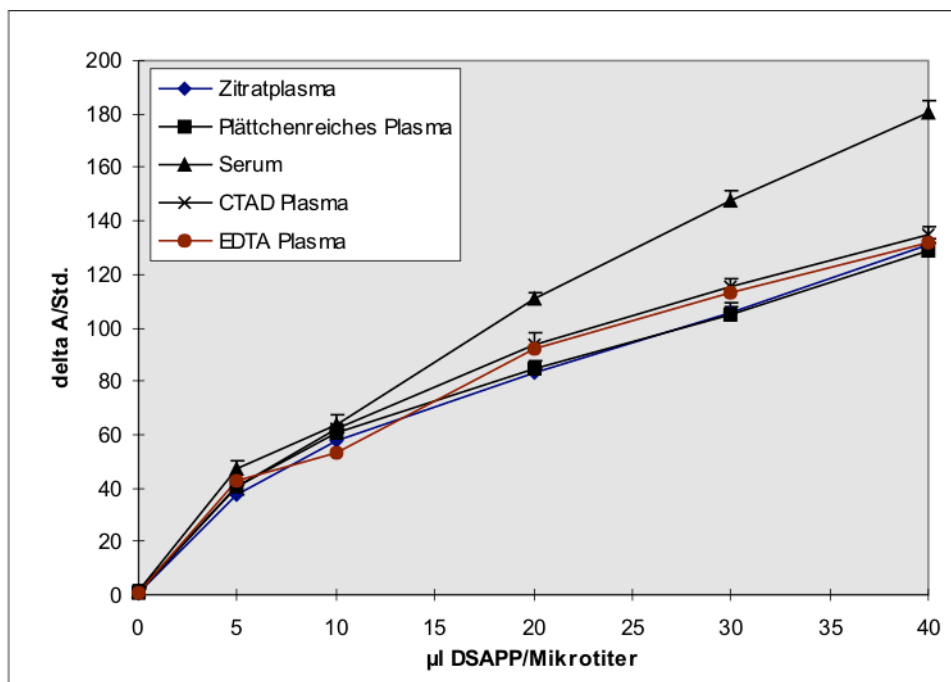
**Abbildung 33:** Evaluation des Einflusses von Fibrinfragmenten (FF) im i-PA Assay in Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten Plasmaproben (DSAP) von 6 Gesunden.



**Abbildung 34:** Einfluß des Zusatzes von t-PA und/oder u-PA Antikörpern (t-PA Ak bzw. u-PA Ak) auf die Aktivität von Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten Plasmaproben (DSAP) von 6 Gesunden im i-PA Assay.



**Abbildung 35:** Einfluß des Zusatzes von t-PA (10 IU/ml) und u-PA (10 IU/ml) auf die zu messende Aktivität von Dextransulfat-stimulierten und angesäuerten Plasmaproben im i-PA Assay (n=10), (Standardabweichung in der Abbildung).



**Abbildung 36:** Evaluierung des Einflusses von verschiedenen antikoagulierenden Substanzen auf die Standardkurven mit ansteigenden Mengen von Dextransulfat-stimuliertem und angesäuertem, gepooltem Plasma (Standardabweichung in der Abbildung).

**Tabelle 6:** 50% Hemmprofil der i-PA Aktivität bei Gebrauch unterschiedlicher Inhibitoren

Inhibitor	50% Hemmprofil
Aprotinin	44 KIU/ml
Benzamidin	52 µg/ml
Chymostatin	keine Hemmung
Leupeptin	1,43 µg/ml
Soybean Trypsin Inhibitor	0,33 µg/ml
Lima Bean Trypsin Inhibitor	keine Hemmung
Trypsin Inhibitor (Ovomucoid)	keine Hemmung
Trypsin Inhibitor (frei von Ovomucoid, Weiße vom Hühnerei)	keine Hemmung
Trypsin Inhibitor (Weiße vom Putenei)	keine Hemmung
Trypsin Inhibitor (partiell isoliertes Ovomucoid vom Huhn)	keine Hemmung
Corn Inhibitor	keine Hemmung
PKSI	0,0035 mmol/l

Die Evaluierung der i-PA Aktivität in Zitratplasma, plättchenreichem Plasma, CTAD und EDTA Plasma zeigten einen vergleichbaren Verlauf (Abb.36). Nur die Standardkurve mit Serum lag in ihrer Aktivität höher. Der Unterschied entsprach jedoch der fehlenden 10% Verdünnung des Serums mit dem Antikoagulant.

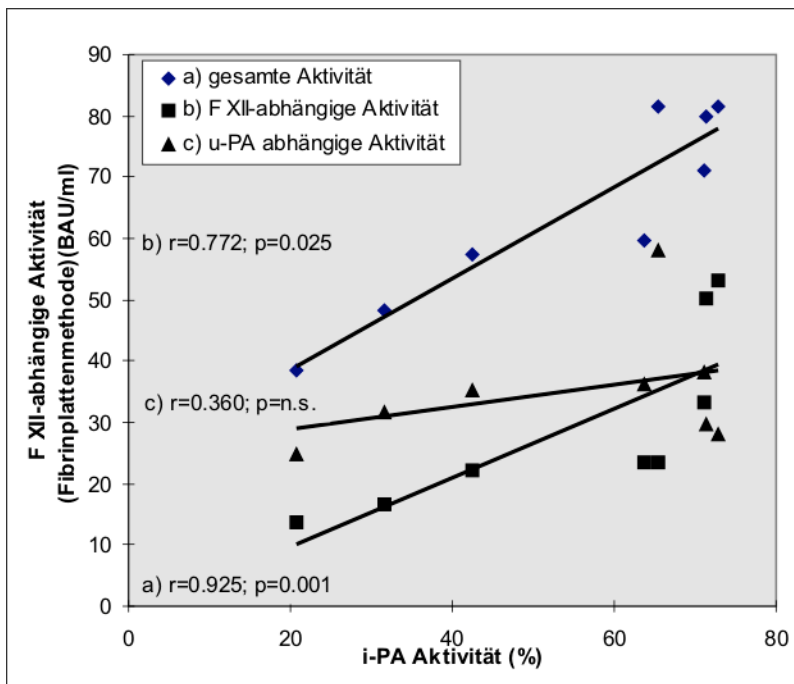
Die Präzision des i-PA Aktivitätsassays wurde im Vergleich zur F XII-abhängigen Aktivität der bereits etablierten Fibrinplattenmethode bestimmt.

Bei 84 Plasmaproben von Patienten mit koronarer Herzkrankheit ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ( $p=0.006$ ,  $r=0.3$ ; Median (Spannweite): 42,8 (9,1-86,3)).

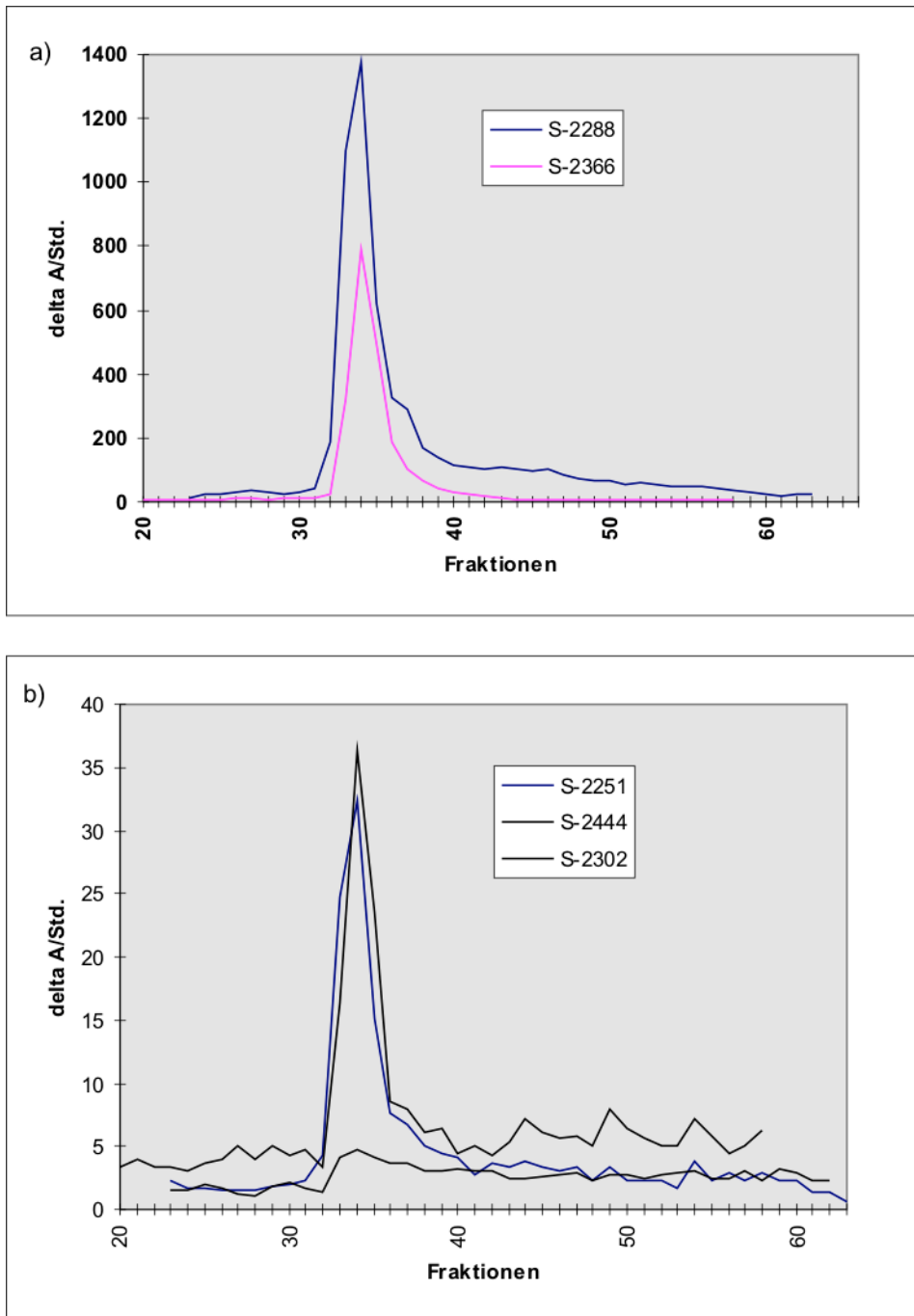
Das Gaubius Institut (Leiden, Niederlande) stellte fünf Plasmaproben, die in unterschiedlichem Ausmaß frei vom F XII-abhängigen Plasminogenaktivator waren, zur Verfügung. Es ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ( $p=0.0002$ ,  $r=0.995$ ) zwischen der Aktivität des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators (Fibrinplattenmethode) und der i-PA Aktivität (i-PA Assay).

Bei 8 Patienten mit Myokardinfarkt wurde die intrinsische fibrinolytische Aktivität mit Fibrinplatten bestimmt, wobei mit Hilfe von u-PA Antikörpern zwischen dem u-PA Anteil und dem F XII-abhängigen Anteil unterschieden wurde. Parallel wurde die i-PA Aktivität im i-PA Assay bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der i-PA Aktivität und der totalen intrinsischen Aktivität und zwischen dem F XII-abhängigen Teil und der i-PA Aktivität. Keine Korrelation bestand zwischen der i-PA Aktivität und dem u-PA-abhängigen Teil (Abb.37a-c).

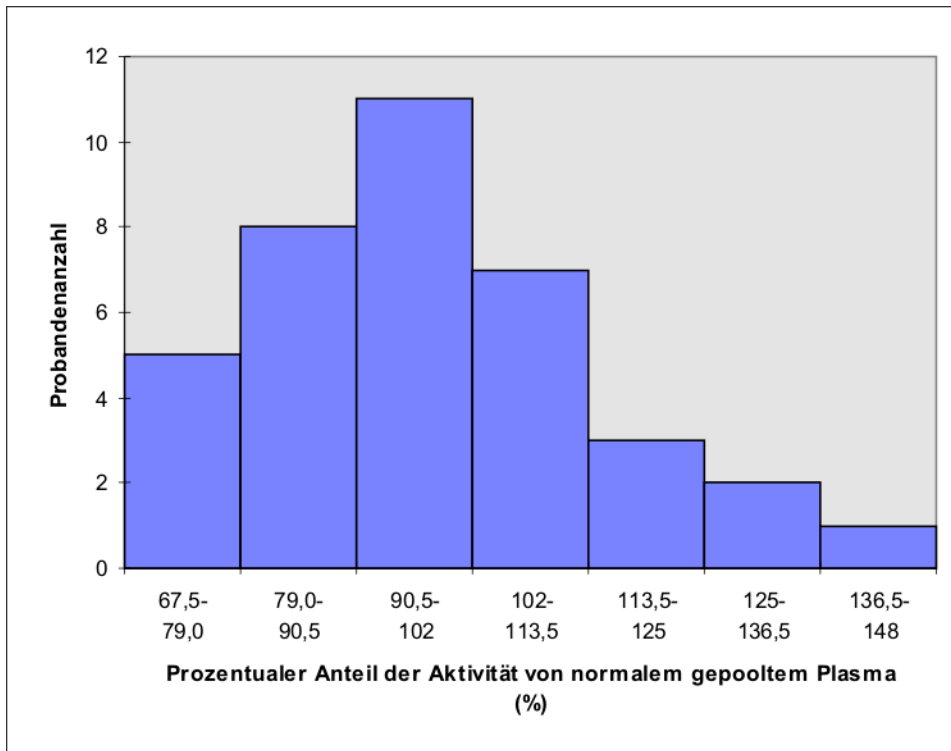
Die Spezifität der Methode wurde mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt. Die Proteine der DSAPP wurden dabei nach ihrem Molekulargewicht fraktioniert erhalten (high liquid gelfiltration column (Superose 12 HR10/30 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (HPLC); Fließrate: 0.4ml/Min.) und die Reaktivität der Einzelfraktionen im i-PA Assay überprüft. Es wurde die i-PA Aktivität in 48 Fraktionen mit Hilfe der chromogenen Substrate S-2288, S-2366 (Abb.38a), S-2251, S-2302 und S-2444 (Abb.38b) gemessen. Es konnte mit allen



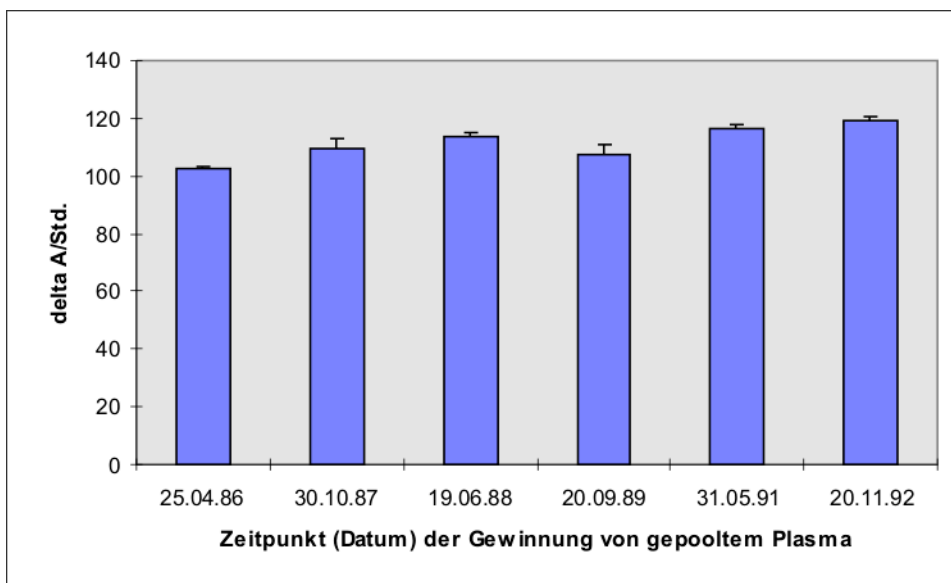
**Abbildung 37:** Korrelation zwischen der Aktivität im i-PA Assay von Dextransulfat-stimulierten, angesäuerten Plasmaproben (DSAP) und der Fibrinplattenmethode mit Dextransulfat-stimulierter Euglobulinfraktion (DEF) (BAU: blood activator units nach Kluft, 1986) bei Plasmaproben von 8 Myokardpatienten. (a) Korrelation zwischen totaler intrinsischer fibrinolytischer Aktivität und i-PA Aktivität, b) F XII-abhängige fibrinolytische Aktivität, d.h. der Aktivität nach Einsatz von u-PA Antikörpern, und i-PA Aktivität und c) u-PA abhängige fibrinolytische Aktivität, d.h. totale Aktivität ohne die F XII-abhängige Aktivität, und i-PA Aktivität.



**Abbildung 38:** Bestimmung der i-PA Aktivität in 48 Proteinfractionen, die entsprechend ihrem Molekulargewicht mit der Methode der Gelfiltration fraktioniert erhalten wurden a) mit Hilfe der chromogenen Substrate S-2228, S2366 und b) mit S-2251, S2302 und S-2444.



**Abbildung 39:** Histogramm der i-PA Aktivität (n=37 Gesunde); Mittelwert mit Standardabweichung: 97 (17,2)%.



**Abbildung 40:** Bestimmung der i-PA Aktivität in 6 gepoolten Plasmaproben, die zu 6 verschiedenen Zeitpunkten im Gaubius Institut, Leiden, Niederlande, vom Blut der Mitarbeiter (n=36) gewonnen wurde; Median (Spannweite 25-75%) = 111,7 (107,3-116,3) (Standardabweichung in der Abbildung).

Substraten nur **ein** isolierter Aktivitätspeak gesehen werden, der einem Molekulargewicht von 134 kD entsprach.

#### **d) detaillierte Beschreibung der evaluierten Methodik**

Frisch gewonnenes und antikoaguliertes Blut wurde sofort auf Eis gelegt und bei 2000g während 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde vorzugsweise bei -70°C eingefroren. Wurde die Probe aufgetaut, geschah dies in einem 37°C warmen Wasserbad bis 3/4 des Plasmas flüssig waren. Die restlichen 1/4 wurden durch Schütteln der Probe bei Raumtemperatur aufgelöst. Das Plasma wurde anschließend sofort mit Azetatpuffer (pH=3.9, 0.2 molar) im Verhältnis 1:1 angesäuert. Zu 100 Volumenprozent des resultierenden angesäuerten Plasmas (AP) wurden 75 Volumenprozent DS (MG 1.000.000) zugefügt. Nach sorgfältiger Mischung und einer Inkubation von 20 Minuten erhielt man DSAP. Da Voruntersuchungen (s. Abb.23, Abb.24a,b)) gezeigt hatten, daß das so gewonnene DSAP bis zu 2 Stunden lang seine Aktivität nicht veränderte, war eine parallele Bestimmung der Aktivität von mehreren Plasmaproben möglich. DSAP hatte einen pH von  $4.4 \pm 0.2$  und das Plasma war 3.5fach verdünnt. 20 µl DSAP wurden auf Mikrotiterplatten pipetiert, die 135 µl Puffer pro Vertiefung (0.1 M Tris-HCL/ 0.1% Tween 80, pH 8.47) enthielten. Als letzter Schritt wurde das chromogene Substrat S-2251 (Chromogenix) mit einer Endkonzentration von 0.69 mmolar (verdünnt mit dem Tris-Tween Puffer) in jede Vertiefung gegeben. Die spektrophotometrischen Veränderungen der Absorption pro Stunde bei 405 nm wurde während 2 Stunden in 15 minütigen Abständen aufgezeichnet und die Aktivität ausgedrückt als Prozent der Aktivität von gepooltem Normalplasma (DSAPP) - abgelesen an einer Standardkurve mit verschiedenen Verdünnungsstufen von Normalplasma. Zur Bestimmung von Nullwerten wurde die DS Stimulation ersetzt durch Zugabe von destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>OAPP). Diese Nullwerte - meist Null - wurden von den DSAP bzw. in der Standardkurve von den DSAPP Werten abgezogen, um die i-PA Aktivität zu erhalten.

#### **e) Normalwerte und Verteilung der i-PA Aktivität**

Bei der i-PA Aktivität konnte Normalverteilung (5%) (Martinez und Iglewicz Test, 226) mit einem signifikanten Normalitätstestwert (1,185) gemessen werden (Abb.39).

Zusätzlich wurde die i-PA Aktivität in gepooltem Plasma bestimmt, das zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von 3 Jahren gewonnen worden war (Abb.40).

### **5.2.2. Bestimmung der Parameter des intrinsischen fibrinolytischen Systems während orthotoper Lebertransplantation**

In der folgenden Untersuchung wurden die u-PA Parameter nicht mit dem kommerziell erhältlichen Kit von Biopool sondern mit den sensitiveren in Leiden entwickelten Assays gemessen (scu-PA und tcu-PA im BIA und die Summe von scu-PA, tcu-PA und tcu-PA-Inhibitorcomplexen, d.h. u-PA Ag im ELISA) (vgl.3.3.1.).

Die i-PA Aktivität wurde mit Hilfe der neu entwickelten chromogenen Substratmethode bestimmt (s.5.2.1.).

### 5.2.2.1. u-PA

In einer ersten Studie (129,134) untersuchten wir das Verhalten von u-PA während OLT. Bei 29 Patienten (Tab.2) wurden zu 7 verschiedenen Zeitpunkten während der OLT arterielle Blutproben entnommen. Alle Patienten erhielten intraoperativ eine kontinuierliche Aprotinin-Infusion beginnend mit 0,2 Millionen KIU/Std. mit Anästhesiebeginn und 0,4 Millionen KIU/Std. mit Beginn der anhepatischen Phase. Mit Operationsende wurde die Dosierung auf 0,1 Mill. KIU/Std. reduziert und Heparin in einer Dosierung von 250 IE/Std. gegeben.

Es wurden die Konzentrationen von u-PA Ag, scu-PA, tcu-PA und die t-PA Aktivität bestimmt. Zeichen einer Hyperfibrinolyse oder gesteigerten Fibrinolyse wurden mit dem TEG erfaßt (s.3.3.1.).

**Tabelle 7:** Diagnose und Charakteristika von 29 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>	<b>weibl.</b>	<b>männl.</b>	<b>Alter*</b>
<b>Postnekrotische Zirrhose</b>	15	6	9	43(22-63)
<b>Alkoholtoxische Zirrhose</b>	3	2	1	57(46-60)
<b>Akute Hepatitis</b>	2	2	0	25,37
<b>Primäre biliäre Zirrhose</b>	4	4	0	50(40-47)
<b>Primäre sklerotische Zirrhose</b>	4	0	4	48(42-56)
<b>Leberzellcarcinom</b>	1	0	1	44
<b>Total</b>	29	14	15	44,5(22-63)

\*Median(Spannbreite) in Jahren

#### 5.2.2.1.1. Ergebnisse (1)

Mittels TEG fanden sich keine Anhaltspunkte für eine signifikante Hyperfibrinolyse (119) bei allen 29 OLTs während des Beobachtungszeitraumes bis 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion. Zeichen einer gesteigerten Fibrinolyse mit Hilfe der MA+45/MA Ratio waren am ausgeprägtesten in der anhepatischen Phase (Abb.41).

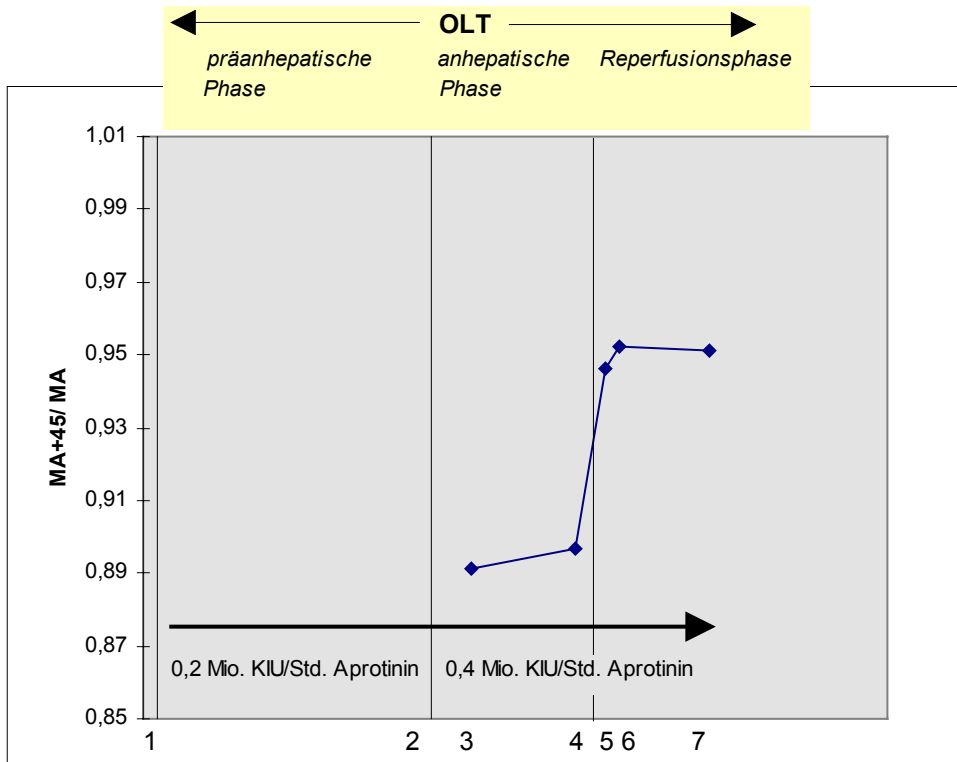
Präoperative Medianwerte von u-PA Ag und scu-PA lagen mehr als 2-fach höher als die medianen Normalwerte ( $p > 0.01$ ). Am Ende der präanhepatischen Phase konnte ein leichter Abfall beider Parameter (Abb.42) (scu-P:n.s.) beobachtet werden gefolgt von stabilen Werten in der anhepatischen Phase. Mit Reperfusion der Spenderleber kam es zu hochsignifikanten Abfällen von u-PA Ag und scu-PA, die 60 Minuten später nur noch minimal erhöht waren (u-PA Ag) bzw. völlig (scu-PA) im Normalbereich lagen.

Präoperative Medianwerte der tcu-PA Konzentration (Abb.42) lagen deutlich über der Nachweisgrenze; in einem Kollektiv von gesunden Probanden lagen sie hingegen unterhalb der Nachweisgrenze (119). Nach einem nicht signifikanten Abfall in der präanhepatischen und anhepatischen Phase konnte während letzterer ein signifikanter zweifacher Anstieg der tcu-PA Werte gesehen werden. Der sich anschließende Abfall erreichte erst 60 Minuten nach Reperfusionsbeginn ein Signifikanzniveau. Die Werte lagen jedoch zu diesem Zeitpunkt noch immer 2-fach über der Nachweisgrenze und unterschieden sich nicht von den Ausgangswerten. Bei 3 Patienten lagen die tcu-PA Werte während der gesamten Operation unterhalb der Nachweisgrenze.

Die t-PA Aktivitätswerte lagen präoperativ im oberen Normalbereich. Während der präanhepatischen und anhepatischen Phasen (Abb.43) zeigte die t-PA Aktivität einen allmählichen Anstieg, der am Ende der anhepatischen Phase Signifikanzniveau erreichte. Mit Reperfusion kam es zu einem Abfall der t-PA Aktivitätswerte in den Normalbereich.



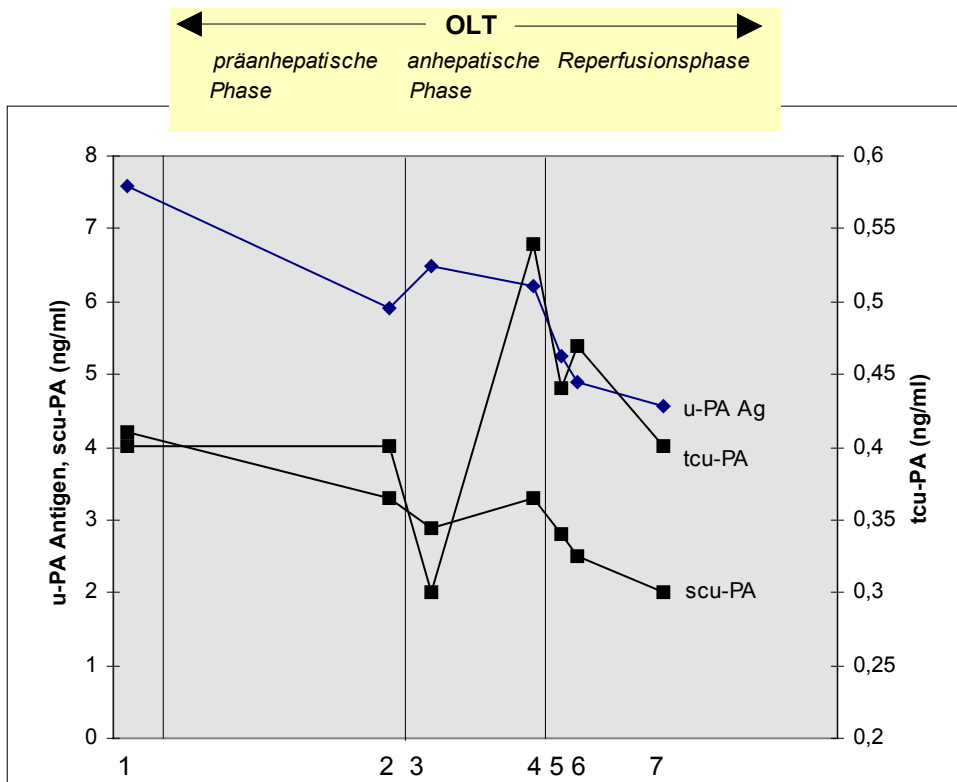
Einer der 29 transplantierten Patienten wurde von den statistischen Berechnungen in Abb.42 und 43 ausgeschlossen, weil die präoperativen u-PA und t-PA Werte extrem hoch lagen und



**Abbildung 41:** Verhältnis der Thrombelastogrammparameter MA +45 (=Amplitude 45 Minuten nach der Maximalamplitude (MA)) und MA (= MA+45/MA Ratio) im Verlauf von 29 orthotopen Lebertransplantationen in der anhepatischen Phase und in der Reperfusionsphase.

Spannweiten					
Zeitpunkt	3	4	5	6	7
MA+45/MA	0,75-0,92	0,82-0,95	0,82-0,97	0,8-0,99	0,87-0,97

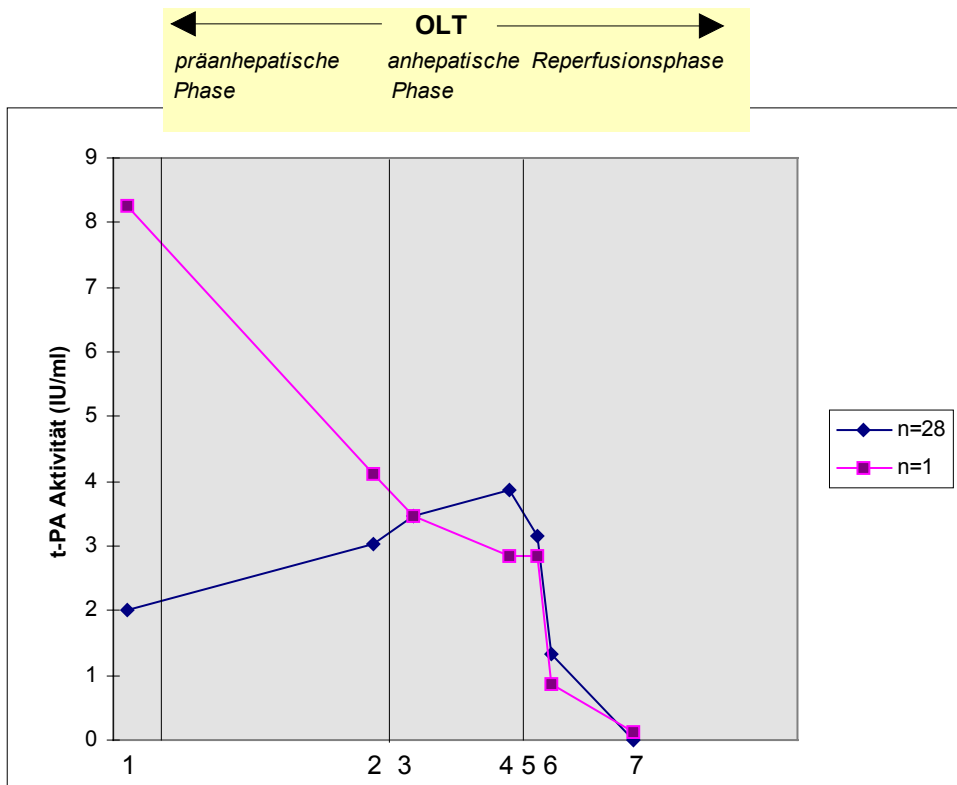
Statistische Signifikanzen				
	p(3/6)	p(3/7)	p(4/6)	p(4/7)
MA+45/MA	= 0.0046	= 0.0052	= 0.0029	= 0.0026



**Abbildung 42:** Verlauf der Konzentrationen von urokinase-type Plasminogenaktivator Antigen (u-PA Ag), single chain u-PA (scu-PA) und two chain u-PA (tcu-PA) während 28 orthotoper Lebertransplantation.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
u-PA Ag (ng/ml)	3-14,5	2,1-11	1,8-9	2,5-10	2,6-8,8	2,4-8	1,7-8
scu-PA (ng/ml)	0-6,54	1,7-6,7	0,7-5,3	1,2-5,7	0,8-4,4	0,7-4	3-5,2
tcu-PA (ng/ml)	0-1	0-0,9	0-1	0-1,14	0-0,9	0-0,9	0-1

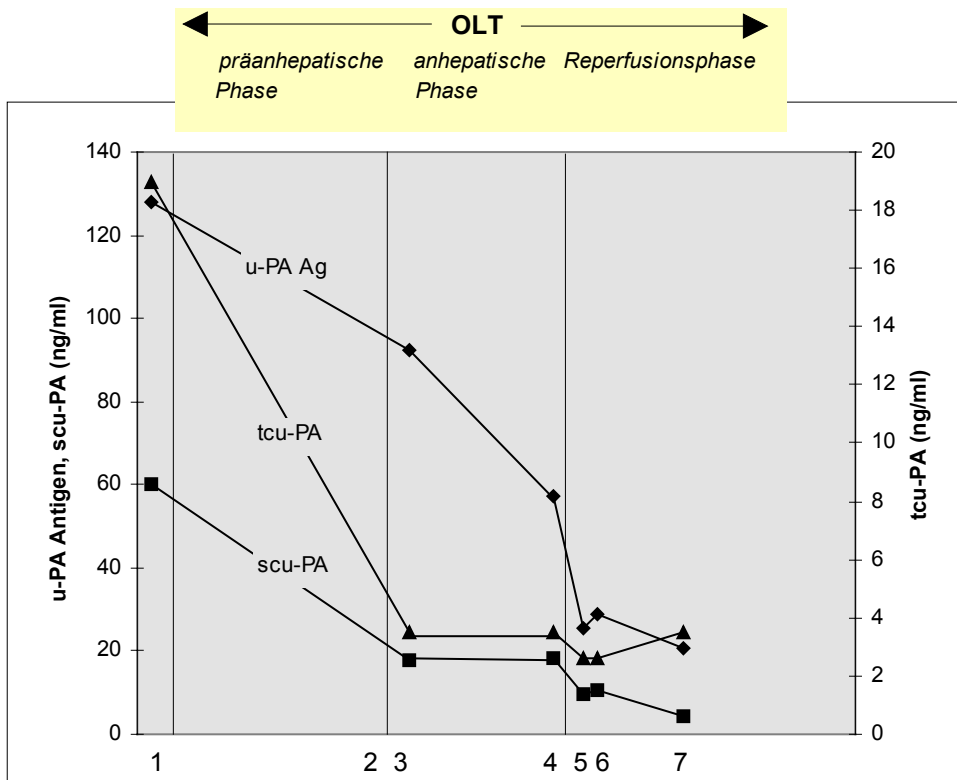
Statistische Signifikanzen				
u-PA Ag	p(1/2)=0.002	p(4/5)=0.0003	p(4/6)=0.0004	p(4/7)=0.000001
scu-PA		p(4/5)=0.006	p(4/6)=0.0001	p(4/7)=0.0007
tcu-PA	p(3/4)=0.0235			p(4/7)=0.0335



**Abbildung 43:** Verlauf der t-PA (tissue-type Plasminogenaktivator) Aktivitäten in 28 orthotopen Lebertransplantationen und einer getrennt ausgewerteten Transplantation mit hochsignifikant höheren Ausgangswerten.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
t-PA Akt. (IU/ml)	0-3,6	0-26,8	0,3-19	1,2-17	0-29	0-27	0-7,1

Statistische Signifikanzen			
t-PA Aktivität	p(1/4)=0.0023	p(4/6)=0.0002	p(4/7)=0.00001



**Abbildung 44:** Verlauf von urokinase-type Plasminogenaktivator Antigen (u-PA Ag), single chain u-PA (scu-PA) und two chain u-PA (tcu-PA) bei einer Patientin, deren Werte während der orthotopen Lebertransplantation getrennt ausgewertet wurden, da hochsignifikant höhere Ausgangswerte vorlagen.

die Wahrscheinlichkeit, daß diese Konzentrationen von u-PA Ag, scu-PA und tcu-PA und die t-PA Aktivitätswerte Teil der untersuchten Gruppe der anderen OLTs waren, geringer als  $10^{-5}$  ( $p(u\text{-PA Ag}) < 10^{-7}$ ,  $p(scu\text{-PA}) < 10^{-5}$ ,  $p(tcu\text{-PA}) < 10^{-5}$ ,  $p(t\text{-PA}) < 10^{-5}$ ) war (116). Es handelte sich um eine 22-jährige Frau, die seit 14 Jahren an einer autoimmunen Hepatitis mit schwerer Leberzirrhose litt. Bei der Laparatomie zeigte sich eine diffuse Peritonitis mit 6 Litern purulenter Aszitesflüssigkeit. Während der OLT fielen die u-PA Ag Werte von präoperativ 128 auf 20,5 ng/ml, die scu-PA Werte von 70,2 auf 4,5 ng/ml und die tcu-PA Werte von 19 auf 3,5 ng/ml ab (Abb.44). Die t-PA Aktivitätswerte waren 8,25 IU/ml zu Beginn der Operation und fielen während der Operation auf 0,010 IU/ml ab (Abb.43). Zwei Tage nach der OLT kam es bei der Patientin zu diffuser intraabdomineller Blutung mit konsekutivem Transplantatversagen, das eine Retransplantation erforderlich machte. Diese verlief erfolgreich. In der untersuchten Gruppe war dies die einzige Patientin mit diffuser Peritonitis intraoperativ und schweren Blutungskomplikationen postoperativ, die zur Retransplantation führten.

#### 5.2.2.1.2. Diskussion (1)

Die erhöhten u-PA Werte im Plasma präoperativ sind vereinbar mit der verlängerten Halbwertszeit von u-PA bei Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung (179). Der geringfügige, jedoch teilweise signifikante Abfall von u-PA Ag und scu-PA während der präanhepatischen Phase könnte als transfusioneller Verdünnungseffekt erklärbar sein. In der anhepatischen Phase war jedoch auffällig, daß es trotz Fehlen der hepatischen Clearance von u-PA nicht zu einem Anstieg von u-PA Ag und scu-PA kam. Wäre für u-PA die Leber nicht nur Clearanceorgan sondern auch Syntheseort, würde der Ausfall **beider** Funktionen in der anhepatischen Phase die relativ stabilen Werte erklären.

Tcu-PA, d.h. die aktive u-PA Form, stieg in der anhepatischen Phase signifikant an. Dieses macht einen Prozeß der scu-PA Aktivierung in dieser Phase wahrscheinlich. Parallel ist ein langsamerer, aber ebenfalls signifikanter Anstieg der t-PA Aktivität zu beobachten.

Der Abfall der u-PA Parameter mit Revaskularisation der Spenderleber ist durch die beginnende hepatische Clearance erklärt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß erstens neben t-PA auch u-PA eine Rolle bei der Entwicklung der gesteigerten Fibrinolyse bei OLT spielt und daß zweitens die vorliegenden Daten die Leber als u-PA Syntheseorgan wahrscheinlich machen.

In einer 2. Untersuchung (138) wurden bei 43 OLTs (Tab.3) u-PA Parameter im Perfusat der Spenderleber und in der korrespondierenden systemischen Zirkulation 5 Minuten nach Reperfusion gemessen. Elf Patienten erhielten Aprotinin als dreimaligen Bolus (Abb.6) und die folgenden 32 Patienten als kontinuierliche Infusion (vgl.5.2.2.1.).

**Tabelle 8:** Diagnose und Charakteristika von 43 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation (Alter (Median (Spannbreite) in Jahren)

Diagnose	Aprotinin als Bolusgabe			Aprotinin als Infusionsgabe		
	weibl.	männl.	Alter*	weibl.	männl.	Alter*
Postnekrotische Zirrhose	2	3	50(45-64)	7	11	45(22-63)
Alkoholtoxische Zirrhose	3	1	48(39-55)	2	2	54(46-60)
Akute fulminante Hepatitis	0	0	-	2	0	25,57
Primäre biliäre Zirrhose	0	0	-	4	0	50(40-47)
Primäre sklerotische Cholangitis	0	0	-	0	4	48(42-56)
Sekundäre biliäre Zirrhose	0	1	51	0	0	-
Budd-Chiari Syndrom	1	0	46	0	0	-
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>49(39-64)</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>45(22-63)</b>

\*Median(Spannbreite) in Jahren

#### 5.2.2.1.3. Ergebnisse (2)

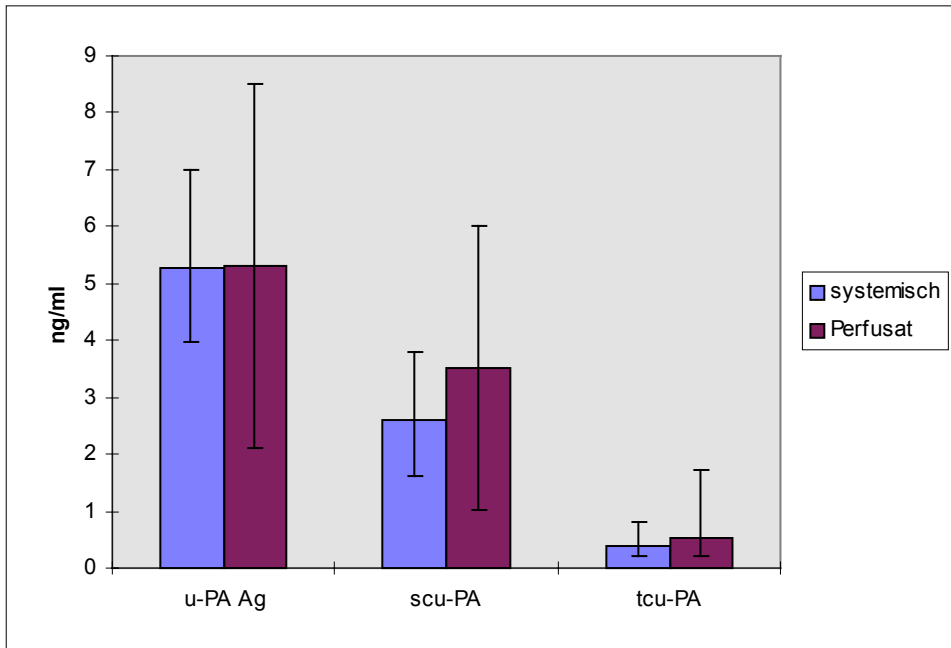
Die medianen u-PA Ag Werte lagen im Perfusat und in der korrespondierenden Zirkulation 1.6-fach über den Medianwerten einer Kontrollgruppe von 50 Gesunden ( $p < 0.01$ ) (Abb.45). Die Perfusatspiegel lagen gering, aber signifikant höher als die systemischen Spiegel. Wurde die Art der Aprotinigungabe berücksichtigt, ergab sich bei Bolusgabe kein signifikanter Unterschied zwischen Perfusat und systemischen Spiegeln, während bei höherdosierter Infusionsgabe die Werte im Perfusat signifikant über den systemischen Werten lagen (Abb.46).

Die medianen scu-PA Werte lagen im Vergleich zum Normalkollektiv systemisch 1.2-fach und im Perfusat 1.7-fach höher (beide:  $p < 0.01$ ). Sowohl in der gesamten Gruppe als auch in der Unterteilung nach Art der Aprotininapplikation lagen die Perfusatwerte signifikant über den korrespondierenden systemischen Werten (Abb.45,46).

Die medianen tcu-PA Werte lagen systemisch 2-fach und in den Perfusatproben 2.6-fach über der Nachweisgrenze (Abb.45). Sowohl in der gesamten Gruppe als auch bei Bolusgabe lagen die tcu-PA Werte im Perfusat signifikant über den systemischen Werten.

#### 5.2.2.1.4. Diskussion (2)

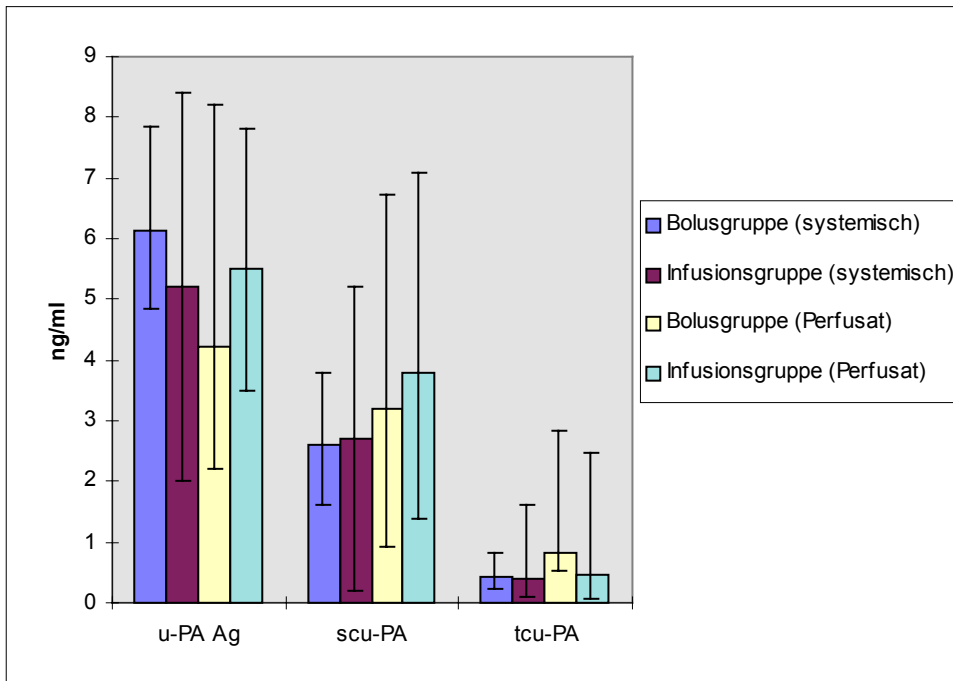
Bei der Interpretation der Ergebnisse muß man sich vergegenwärtigen, daß das Perfusat eine Mischung aus Blut und Konservierungslösung ist. Es ist daher von einer erniedrigten Konzentration der Plasmaproteine im Perfusat im Vergleich zur systemischen Zirkulation auszugehen (vgl.Tab.10). Die deutlich erhöht gemessenen u-PA Parameter im Perfusat sprechen daher für eine hepatische u-PA Freisetzung als Hinweis auf eine mögliche hepatische Synthese.



**Abbildung 45:** Konzentrationen von urokinase-type Plasminogenaktivator Antigen (u-PA Ag), single chain u-PA (scu-PA) und two chain u-PA (tcu-PA) im Perfusat (P) und der korrespondierenden systemischen Zirkulation (S) bei 43 orthotopen Lebertransplantationen (Spannweiten in der Abbildung).

Statistische Signifikanzen	
u-PA Ag	p(P/S)<0.01
scu-PA	p(P/S)<0.01
tcu-PA	p(P/S)<0.01





**Abbildung 46:** Konzentrationen von urokinase-type Plasminogenaktivator Antigen (u-PA Ag), single chain u-PA (scu-PA) und two chain u-PA (tcu-PA) im Perfusat (P) und in der korrespondierenden systemischen Zirkulation (S) bei 11 orthotopen Lebertransplantationen, bei denen Aprotinin als Bolus und bei 32 orthotopen Lebertransplantationen, bei denen Aprotinin als höherdosierte Infusion gegeben wurde (Spannweiten in der Abbildung).

Statistische Signifikanzen		
	Infusionspatienten	Boluspatienten
u-PA Ag	p(P/S)<0.01	p(P/S) n.s.
scu-PA	p(P/S)<0.05	p(P/S)<0.05
tcu-PA	p(P/S) n.s.	p(P/S)<0.05

Wurden die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Art der Aprotininapplikation ausgewertet, ergab sich, daß in Gegenwart höherer Aprotininwerte (Infusionsgabe) tcu-PA Werte vergleichbar in Perfusat und systemischer Zirkulation waren, während u-PA Ag und scu-PA Werte im Perfusat signifikant höher lagen. Bei niedrigeren Aprotininwerten (Bolusgabe) waren die u-PA Ag Werte in Perfusat und systemischer Zirkulation vergleichbar. Scu-PA und tcu-PA lagen jedoch im Perfusat signifikant höher.

Durch die unterschiedliche Patientenzahl bei der Gabe von Aprotinin als Bolus- bzw. Infusion ist die Vergleichbarkeit von Werten im Perfusat und systemischer Zirkulation begrenzt. Dieses könnte erklären, warum die höheren u-PA Ag Werte im Perfusat der größeren Infusionsgruppe in der kleineren Bolusgruppe nicht wiedergefunden wurden. Höhere tcu-PA Perfusatspiegel bei Aprotininbolusgabe und fehlender Unterschiedlichkeit bei Infusionsgabe sprechen für eine verstärkte scu-PA Aktivierung in der Spenderleber in Gegenwart niedrigerer Aprotininspiegel. Tcu-PA wird durch hydrolytische Spaltung von scu-PA unter Einwirkung der Proteasen Plasmin und Kallikrein freigesetzt (10). Beide werden durch Aprotinin gehemmt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich mit der Vorstellung vereinbaren, daß höhere Konzentrationen von Aprotinin (Abb.67) die Freisetzung beider Proteasen und damit die tcu-PA Entstehung hemmen. Auswirkungen des für Aprotinin beschriebenen zytoprotektiven Effektes (210) konnten bei den vorliegenden Ergebnissen nicht gefunden werden. Eine höhere Aprotininkonzentration führte nicht zur verminderten hepatischen u-PA Freisetzung.

#### 5.2.2.2. i-PA

Wir untersuchten die aktivierbare i-PA Aktivität im Verlauf von 47 OLTs (Tab.9). 13 Patienten erhielten Aprotinin als Bolus (Abb.6) - und 34 Patienten als Infusionsgabe (s.5.2.2.1.).

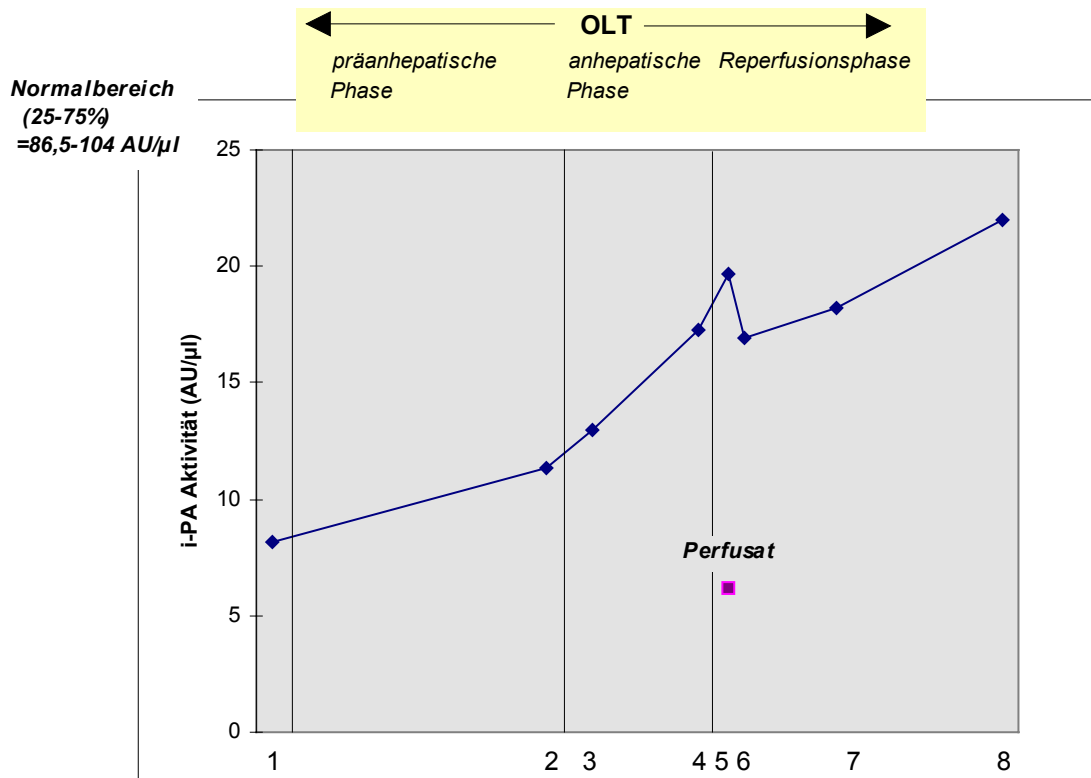
**Tabelle 9:** Diagnose und Charakteristika von 47 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

Diagnose	Anzahl	weibl.	männl.	Alter*
Postnekrotische Zirrhose	23	9	14	47(21-64)
Alkoholtoxische Zirrhose	8	5	3	52(39-60)
Akute Hepatitis	3	3	0	29(23-37)
Budd-Chiari Syndrom	1	1	0	46
Primäre biliäre Zirrhose	4	4	0	50(40-47)
Sekundäre biliäre Zirrhose	1	0	1	51
Primäre sklerotische Zirrhose	4	0	4	48(42-56)
Leberzellcarcinom	2	0	2	45,60
Metastasenleber	1	0	1	45
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>44(21-63)</b>

Median(Spannbreite) in Jahren

#### 5.2.2.2.1. Ergebnisse

Präoperative i-PA Aktivitätswerte waren signifikant ( $p < 0.0001$ ) tiefer als in einer normalen Kontrollgruppe ( $n=37$ , vgl.5.2.1.e)).



**Abbildung 47:** Intrinsische Plasminogenaktivator (i-PA) Aktivität im Verlauf von 47 orthotopen Lebertransplantationen und im Perfusat (P).

Spannweiten									
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	P
i-PA AU/μl	0-79,3	1-100,4	3,4-82,6	6,7-74,2	6-76,2	2,3-77,8	7,7-50	12,9-48,9	1,1-43,9

Statistische Signifikanzen					
i-PA	p(3/5)=0.0031	p(3/4)=0.0024	p(5/6)=0.0019	p(4/P)=0.0000	p(5/P)=0.000

Bis zum Ende der anhepatischen Phase und in der frühen Reperfusionsphase war ein signifikanter Anstieg der i-PA Aktivität erkennbar gefolgt von einem Abfall 15 Minuten nach Reperfusionsbeginn. Die Perfusatspiegel lagen hochsignifikant unter den Spiegeln in der systemischen Zirkulation (Abb.47). Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Aprotininmedikation fielen signifikant niedrigere Spiegel in der höherdosierten Infusionsgruppe auf bei tendenziell gleichartigem Verlauf.

#### **5.2.2.2. Diskussion**

Während der anhepatischen Phase kam es zum hochsignifikanten Anstieg der i-PA Aktivität. Bei Interpretation der Werte muß in Betracht gezogen werden, daß intraoperativ bei allen OLTs Aprotinin - in der Mehrzahl der untersuchten Patienten als höher dosierte kontinuierliche Infusion (s.5.2.2.1.) - gegeben wurde. Systemisch wurden dabei mediane Spiegel von 60 KIU/ml zu Beginn der anhepatischen Phase und von 100 KIU/ml zu Beginn der Reperfusion erreicht. Diese Spiegel lagen weit über der 50%igen Inhibitor-dosis von Aprotinin (5.2.1.c)) gegenüber der i-PA Aktivität und erklärten daher die im Vergleich zu Normalpersonen deutlich niedrigeren i-PA Spiegel. Der beobachtete anhepatische i-PA Anstieg wurde trotz der Dosiserhöhung der Aprotininmedikation zu diesem Zeitpunkt beobachtet. Bei fehlender Aprotininmedikation wäre daher in diesem Zeitraum eine wesentlichere Steigerung der i-PA Aktivität zu erwarten. Es kann somit von einer Steigerung der aktivierbaren i-PA Aktivität während der anhepatischen Phase ausgegangen werden. Die hochsignifikant niedrigeren i-PA Werte im Perfusat lassen sich durch die Verdünnung mit Konservierungslösungsresten (vgl.Kapitel 5.6.) erklären. Sie sprechen gegen eine hepatische Freisetzung bzw. Synthese von i-PA.

#### **5.2.2.3. Zusammenfassende Diskussion**

Beim intrinsischen fibrinolytischen System müssen zunächst Proaktivatoren aktiviert werden. Dieses kann indirekt durch Plasminentstehung im Rahmen des extrinsischen fibrinolytischen Systems oder direkt durch externe Triggermechanismen wie Fremdoberflächenkontakt des Blutes gegeben sein. Die potentielle Aktivität des intrinsischen fibrinolytischen Systems liegt weit über der Kapazität des extrinsischen Systems (188).

Während der anhepatischen Phase der OLT konnte eine deutliche Steigerung der intrinsischen fibrinolytischen Aktivität (i-PA, u-PA) gefunden werden (Abb.48). Der hypothetisch verantwortliche Pathomechanismus führt zunächst zur t-PA Erhöhung zum einen durch das Fehlen der Leber als Clearanceorgan von t-PA und zum anderen durch Stauung des Blutes im venösen System mit vermehrter endothelialer t-PA Freisetzung. In einer Untersuchung (12) wurde der anhepatische t-PA Anstieg in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines venovenösen Bypasses untersucht. Es ergaben sich keine Unterschiede, sodaß der venovenöse Bypass keinen Einfluß auf die t-PA Spiegel zu haben scheint. Operativ gesteigerte Fibrinbildung erhöht zusätzlich die t-PA Aktivität. Es kommt zunächst lokal - im Bereich der Fibringerinnsel - zur t-PA induzierten Plasmingenerierung. Plasmin baut Fibrin ab und initiiert andererseits die Aktivierung des intrinsischen fibrinolytischen Systems. Es überführt scu-PA in seine zweikettige Form, aktiviert F XII und führt damit zur Kallikreingeneration, wodurch die Voraussetzungen zur i-PA Aktivierung gegeben sind (Abb.2). Die intrinsischen Plasminogenaktivatoren tcu-PA und i-PA führen in einer feed-back Reaktion zur zunehmenden Plasminfreisetzung, wodurch die primär eher schwache, lokalisierte,

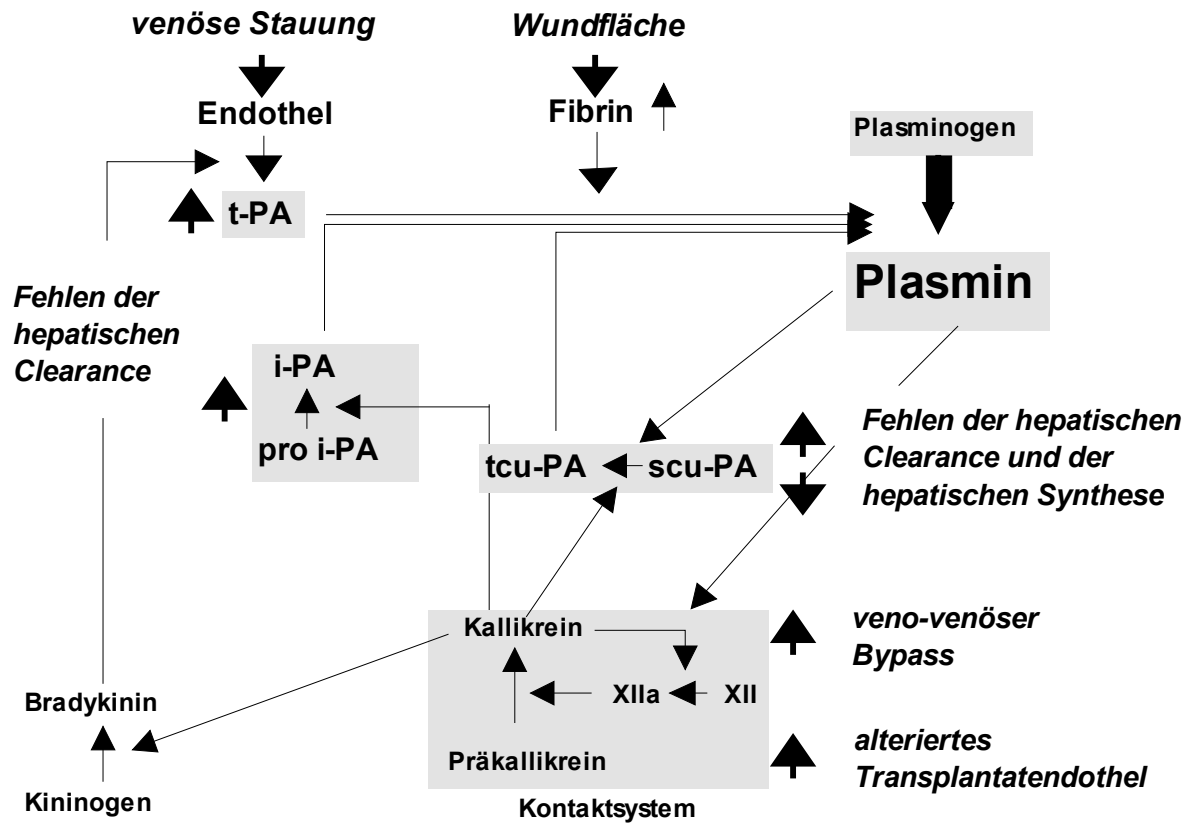
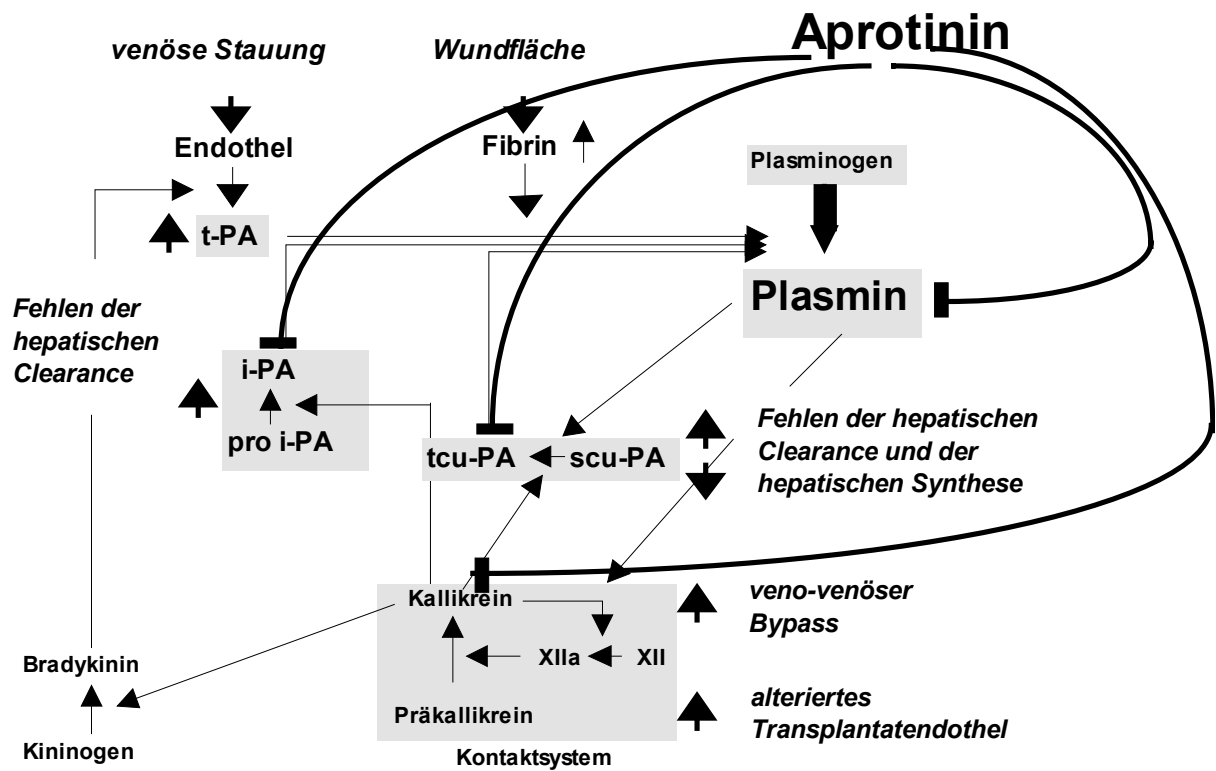


Abbildung 48: Pathophysiologie der Hyperfibrinolyseentwicklung bei der orthotopen Lebertransplantation.



**Abbildung 49:** Therapeutische Ansatzpunkte von Aprotinin bei der Verminderung der Hyperfibrinolyseentwicklung während orthotoper Lebertransplantation.

extrinsische fibrinolytische Aktivität exponentiell gesteigert wird. Darüberhinaus kommt das Blut während der anhepatischen Phase über den veno-venösen Bypass in Kontakt mit einer Fremdoberfläche, wodurch weitergehend eine gesteigerte Aktivierung des Kontaktsystems induziert wird (Abb.48).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß während der anhepatischen Phase mehrere Aktivierungsmechanismen des fibrinolytischen Systems potenzierend ineinandergreifen. Bei Operationen mit kardiopulmonalen Bypässen konnten vergleichbare Ergebnisse gefunden werden (95,189,341).

Das Fehlen der hepatischen Clearancefunktion in der anhepatischen Phase bedingt Aktivitätssteigerungen von t-PA, u-PA und i-PA, die über die jeweiligen Konzentrationsveränderungen hinausgehen und zusammen mit einer verlängerten biologischen Halbwertszeit von freiem Plasmin zu einer mitunter klinisch relevanten Hyperplasminämie bzw. Hyperfibrinolyse führen (Abb.48).

Aprotinin hemmt Kallikrein, Plasmin, i-PA und u-PA und greift auf diese Weise regulierend in eine überschießende Aktivierung des fibrinolytischen Systems ein (Abb.49). Damit erklären sich die weitgehend fehlenden Zeichen einer Hyperfibrinolyse bei höher dosierter Aprotinin-Infusion (126).

Die Ergebnisse machen deutlich, daß das intrinsische fibrinolytische System in Interaktion mit dem extrinsischen fibrinolytischen System entscheidend zur Entwicklung der gesteigerten Fibrinolyse bei OLT beiträgt (118) und daß dem extrinsischen fibrinolytischen System dabei die wesentliche Triggerfunktion zukommt. Weiterhin wird deutlich, daß u-PA durch die Leber geklärt, aber wohl auch synthetisiert wird, während die Leber bei i-PA nur eine Clearancefunktion einnimmt.

Spätere Untersuchungen bestätigten (175) diese Ergebnisse, doch konnten andere Untersucher (296) bei laboranalytischer Beschränkung auf F XII und C<sub>1</sub>-Esteraseinhibitor diese Interpretation nicht untermauern.

### 5.3. Bedeutung der Faktor XIII Aktivität bei orthotoper Lebertransplantation

Wir untersuchten im Verlauf von 10 konsekutiven OLTs (Diagnosen vgl. Tab.10) das Verhalten von F XIII in der systemischen Zirkulation und im Perfusat (131). Dabei wurde die F XIII Aktivität mit dem etablierten Clot Solubilitätstest (166) und einem neu eingeführten photometrischen Assay (85) (vgl. 3.3.2.) gemessen.

Aprotinin wurde als kontinuierliche Infusion gegeben (s.5.2.2.1.).

**Tabelle 10:** Diagnose und Charakteristika von 10 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

Diagnose	Anzahl	weibl.	männl.	Alter*
<b>Postnekrotische Zirrhose</b>	6	3	3	37(21-52)
<b>Primäre biliäre Zirrhose</b>	1	2	0	48(42-51)
<b>Primäre sklerotische Zirrhose</b>	1	1	0	48
<b>Leberzellcarcinom</b>	1	0	1	45
<b>Total</b>	10	6	4	43(21-52)

\*Median(Spannbreite) in Jahren

#### 5.3.1. Ergebnisse

Die Durchführung des photometrischen Assays mit Hilfe eines Autoanalysers war mehr als 10-mal so schnell wie der Clot Solubilitätstest. Es zeigte sich eine sehr gute Präzision innerhalb einer Serie und zwischen verschiedenen Serien ('within-run' und 'day to day precision'), und es konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Werten beider Assays beobachtet werden (Abb.50).

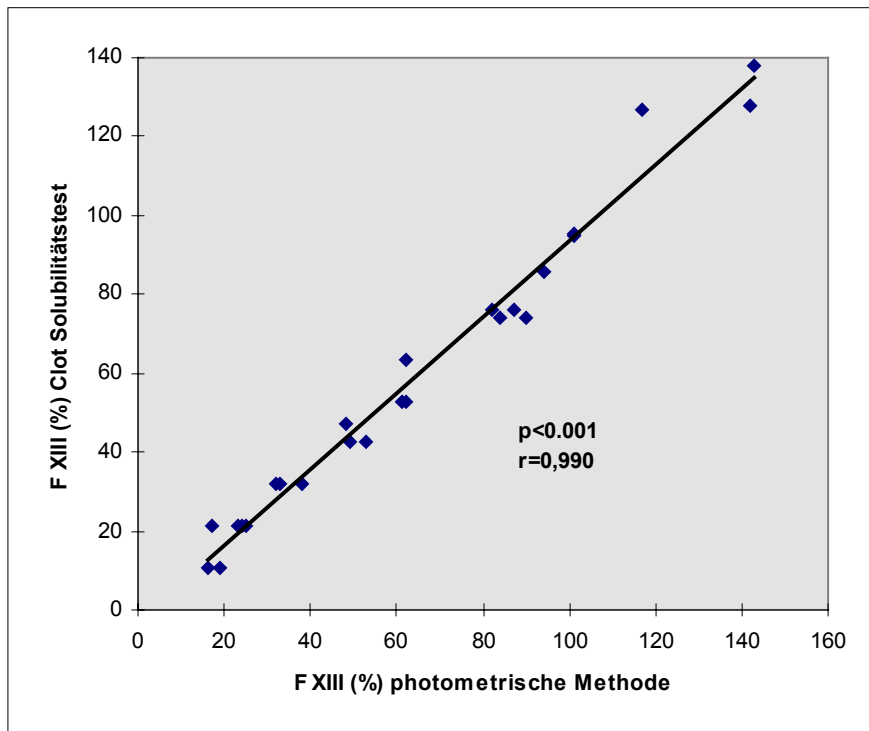
Präoperative F XIII Aktivitätswerte (Abb.51) lagen niedriger als in einer normalen Vergleichsgruppe ( $p < 0.01$ ). Mit Beginn der anhepatischen Phase kam es zum signifikanten Abfall der F XIII Aktivität gefolgt von einem kurzen nicht signifikanten Anstieg in der Reperfusionsphase und einem signifikanten Abfall 10 Minuten später. Im Perfusat lagen die F XIII Aktivitätswerte weit über den systemischen Werten.

#### 5.3.2. Diskussion

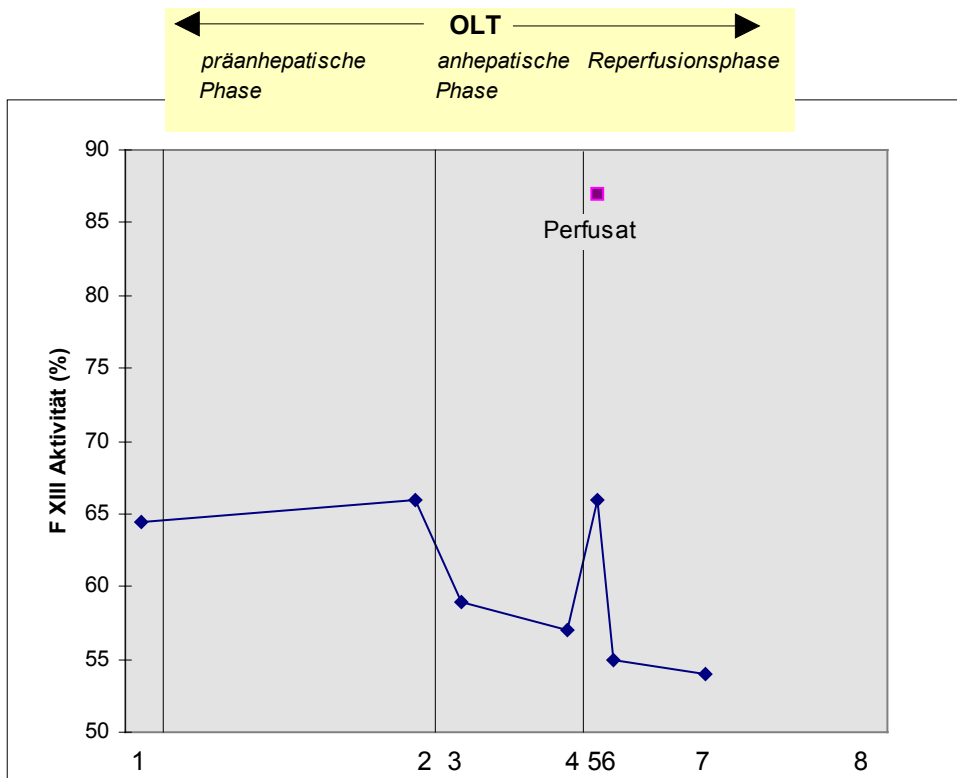
Während Hämostaseaktivierung mit gesteigerter Thrombin- und Fibrinbildung kommt es zu erniedrigten Plasmaspiegeln von F XIII, da F XIII zusammen mit Fibrin präzipitiert. Bei hyperfibrinolytischen Zuständen entsteht vermehrt Plasmin. Dieses führt bei Überschreiten des Inhibitorpotentials zu einem freien Vorkommen von Plasmin im Plasma. Plasmin spaltet nicht nur Fibrin sondern im Plasma auch Fibrinogen, F V, F VIII und F XIII. Bei OLT kommt es sowohl zur Hyperfibrinolyse als auch zur Hämostaseaktivierung. Beide sind in der Lage die F XIII Spiegel zu reduzieren. Es ist daher vorstellbar, daß reduzierte F XIII Spiegel eine bedeutende Rolle bei der erhöhten Blutungsneigung intra- und postoperativ spielen. Einen erworbenen partiellen Mangel an F XIII beobachtet man darüberhinaus bei ausgeprägter Leberzirrhose (20).

Bei den F XIII Untersuchungen im Verlauf der OLTs konnte während der anhepatischen Phase ein Abfall der F XIII Aktivität beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich durch die gesteigerte Fibrinolyse in dieser Phase zu erklären. Eine fehlende hepatische Synthese hat bei der langen Halbwertszeit von F XIII (ca. 50 Stunden) nur eine untergeordnete Bedeutung. Die





**Abbildung 50:** Korrelation zwischen photometrisch gemessenen und im Clot Solubilitätstest bestimmten F XIII Aktivitäten (n=24).



**Abbildung 51:** Verlauf der F XIII Aktivität bei 10 orthotopen Lebertransplantationen und im Perfusat (P).

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
F XIII (%)	32-122	36-136	34-105	46-119	32-98	23-96	17-91	41-143

Statistische Signifikanzen			
F XIII	p(2/3)=0.04	p(5/6)=0.02	p(5/P)=0.07

Spannweite der F XIII Aktivität zeigte, daß es 60 Minuten nach Beginn der Reperfusionphase zu Werten unter 20% bei einigen Patienten kam. Bei kongenitalem F XIII Mangel kommt es erst bei F XIII Werten unter 5% zu Spontanblutungen (214). Jedoch muß davon ausgegangen werden, daß bei den komplexen Gerinnungsstörungen während OLT auch geringgradig erniedrigte Werte an einer gesteigerten Blutungsneigung und einer gestörten postoperativen Wundheilung Anteil haben können (78,115,119,120,125,275). Mit Beginn der Reperfusion und der in dieser Phase nachgewiesenen gesteigerten Prothrombinaktivierung wären abfallende F XIII Werte zu erwarten gewesen. Überraschenderweise lagen die F XIII Werte im Perfusat höher als in der systemischen Zirkulation, und systemisch kam es mit Reperusionsbeginn zum Anstieg der Werte. Dieses spricht für eine F XIII Freisetzung aus der Spenderleber, die den erwarteten F XIII Abfall überlagert. Die Ergebnisse bestätigen Voruntersuchungen der F XIII A und B Untereinheiten bei Knochenmark- und Lebertransplantationen, die deutlich machten, daß das F XIII A Protein in Zusammenhang mit der Hämatopoese (höchstwahrscheinlich in Megakaryozyten) und die F XIII B Untereinheit in der Leber gebildet wird (357).

Die photometrische Bestimmungsmethode zeigte eine hohe Präzision und eine hochsignifikante Korrelation zu dem Clot Solubilitätstest. Dadurch konnten vorhergehende Untersuchungen (85) bestätigt werden. Die photometrische Bestimmungsmethode erlaubt die schnelle und einfache Bestimmung der F XIII Aktivität bei Gerinnungs- und Wundheilungsstörungen. Sie ermöglicht die rasche Detektion einer F XIII Mangelsituation und schafft damit die Voraussetzung zur möglichen Substitutionstherapie, die auch im Rahmen von Blutungskomplikationen bei OLT in Betracht gezogen werden kann.

#### 5.4. Bedeutung leukozytärer Aktivierungsprodukte, Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle und des Endothelzellmarkers Thrombomodulin bei der Pathogenese von Hämostasestörungen während orthotoper Lebertransplantation

##### 5.4.1. Leukozytäre Aktivierungsprodukte

Die Bedeutung der Leukozyten in der Pathogenese der gesteigerten Gerinnungsaktivierung bei OLT wurde durch Bestimmung ihrer Mediatoren, Kathepsin B, Elastase, TNF und Neopterin sowie der TAT Komplexe als Marker vor, während und nach 13 OLTs (Tab.11) untersucht (141). Die Patienten erhielten Aprotinin als kontinuierliche Infusion (s.5.2.2.1.).

**Tabelle 11:** Diagnose und Charakteristika von 13 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

Diagnose	Anzahl	weibl.	männl.	Alter*
Postnekrotische Zirrhose	8	4	4	49 (24-65)
Primäre biliäre Zirrhose	2	2	0	49,52
Primäre sklerotische Zirrhose	2	2	0	42,48
Alkoholtoxische Zirrhose	1	0	1	47
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>48 (24-65)</b>

\*Median(Spannbreite) in Jahren

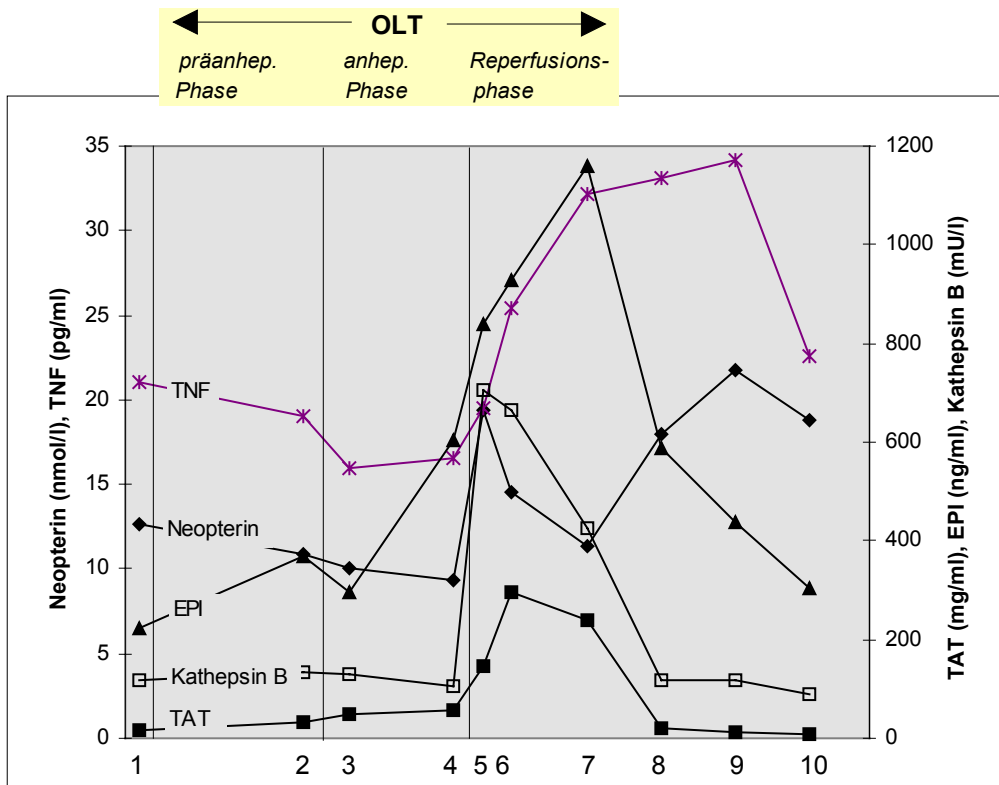
##### 5.4.1.1. Ergebnisse

TAT Komplexe (Abb.52) stiegen langsam in der präanhepatischen und anhepatischen Phase an gefolgt von einem deutlicheren Anstieg in der frühen Reperfusionsphase. In der späteren Reperfusionsphase zwischen einer und 12 Stunden nach Reperfusionsbeginn fielen die Werte signifikant ab mit abgeschwächterem Abfall in den folgenden 48 Stunden. Die Perfusatspiegel der TAT Komplexe lagen tendenziell höher als in korrespondierenden systemischen Proben (Tab.12).

**Tabelle 12:** Leukozytäre Mediatoren im Perfusat (P) und in der korrespondierenden systemischen Zirkulation zum Abnahmezeitpunkt 4 (Werte werden gegeben als Median (Spannweite))

Parameter	Perfusat	systemische Zirkulation (4)	p(P/4)
TNF (pg/ml)	24 (2,5-1020)	16,6 (6,8-52,4)	n.s.
Neopterin (nmol/l)	179 (80-1008)	9,3(5,8-26,4)	0,001
Kathepsin B (mU/l)	45513 (967-524265)	103,5(55,7-204,4)	0,0022
EPI Komplexe (ng/ml)	761 (399-1396)	604 (276-1205)	0,0499
TAT Komplexe (µg/l)	77 (32-1300)	56 (17-381)	0,0995

Die Spiegel des TNF (Abb.52) blieben während der präanhepatischen und anhepatischen Phase unverändert. Mit Revaskularisation der Spenderleber kam es zu einem signifikanten und anhaltenden Anstieg. Maximalwerte wurden 36 Stunden nach Reperfusion gesehen, denen ein hochsignifikanter Abstieg folgte. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen Perfusat- und korrespondierenden systemischen Spiegeln (Tab.12).



**Abbildung 52:** Verlauf der leukozytären Mediatoren (Neopterin, Tumornekrosefaktor (TNF), Elastase- $\alpha_1$ -Proteinasekomplexe (EPI), Kathepsin B) und der Thrombin-Antithrombin III (TAT) Komplexe während und nach 23 orthotopen Lebertransplantationen.

#### Spannweiten

Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TAT (mg/ml)	7,3-50	8,7-66	14,5-93	17-381	46-800	55-925	44-710	6,7-110	4,5-68	6,6-50
TNF (pg/ml)	10,2-99	7,4-36	10,1-118	6,8-52,4	3,5-447	3,6-444	17,2-377	0-117	11,8-103	4-43
Neopterin (nmol/l)	6-23,8	0-26	7,1-26	5,8-26,4	9,1-82,3	8,9-58,4	7,1-36	6-43,3	12,6-63	9,7-121
Kathepsin B (mU/l)	31,3-238	62,8-247	61,5-243	55,7-204	136-16338	158-5469	93-1180	33-309	36,8-458	37,9-444
EPI (ng/ml)	118-1267	150-1000	199-1445	276-1205	352-1353	349-1797	326-1789	239-1971	204-1326	175-605

#### Statistische Signifikanzen

TAT Komplexe:	p(1/2) =0.0022	p(2/3) =0.0108	p(3/4) =0.0376	p(4/5) =0.0455	p(5/6) =0.0096	p(7/8) =0.0022	p(9/10) =0.0022
Tumornekrosefaktor:				p(4/6) =0.0192	p(4/7) =0.0019		p(9/10) =0.0029
Neopterin:				p(4/5) =0.0015	p(5/6) =0.0464	p(6/7) =0.0030	p(8/9) =0.0281
Kathepsin B:				p(4/5) =0.0015	p(6/7) =0.0159	p(7/8) =0.0015	
EPI Komplexe:			p(3/4) =0.0330	p(4/5) =0.0058	p(6/7) =0.0107	p(7/8) =0.0046	p(9/10) =0.0033

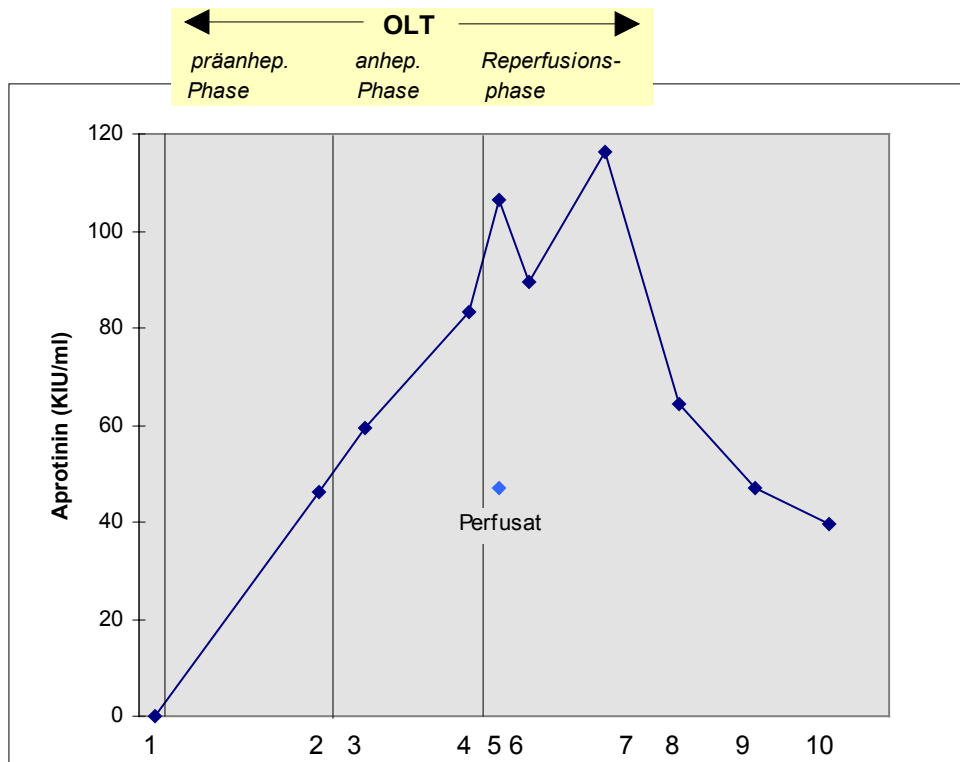
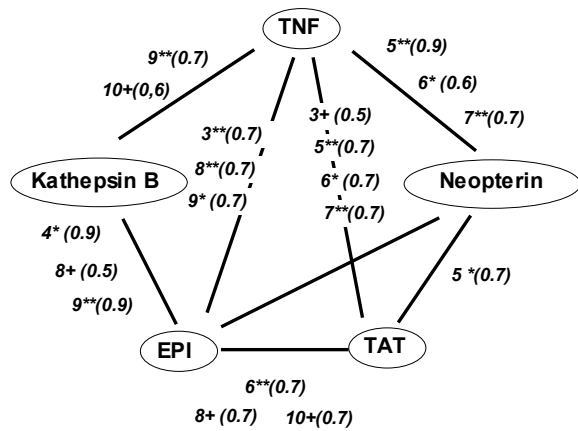
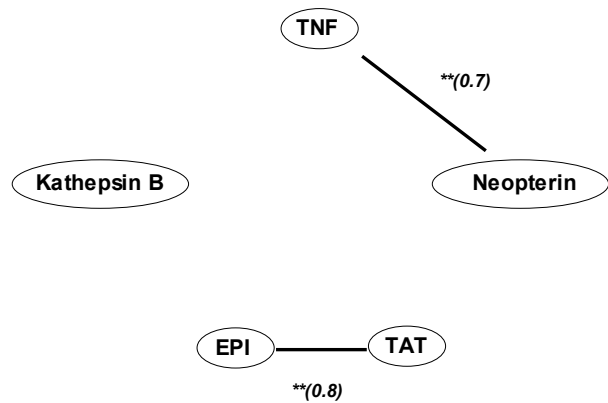


Abbildung 53: Verlauf von Aprotininspiegeln während und nach 23 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten											
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	P
Aprotinin (KIU/ml)	0,1-58,1	21,7-87,8	25,7-151,1	28,4-178,9	41,6-198	0-219,1	46,8-282,5	42,2-142,6	17,8-237	13,8-269,3	27,1-131,3

Statistische Signifikanzen				
Aprotinin	p(1/2)=0.0058	p(2/3)=0.0277	p(3/4)=0.0037	p(7/8)=0.0015    p(8/9)=0.0414

a) **systemische Zirkulation**b) **Perfusat**

**Abbildung 54:** Korrelationen zwischen leukozytären Mediatoren (Neopterin, Tumornekrosefaktor (TNF), Elastase- $\alpha_1$ -Proteinasekomplexe (EPI), Kathepsin B) und Thrombin-Antithrombin III Komplexen (TAT) a) während und nach 23 orthotopen Lebertransplantationen und b) im Perfusat (Abnahmezeitpunkt, Signifikanzniveau der Korrelation (+=tendentiell, \*=signifikant, \*\*=hoch signifikant), Korrelationskoeffizient).

Die Neopterinkonzentrationen (Abb.52) zeigten keine Veränderungen während präanhepatischer und anhepatischer Phase. Mit Reperfusionsbeginn kam es zu einem signifikanten Anstieg mit Maximalwerten 5 Minuten nach Reperfusionsbeginn gefolgt von einem signifikanten Abfall mit Minimum 1 Stunde nach Reperfusionsbeginn und einem zweiten Anstieg mit Maximalwerten 36 Stunden nach Reperfusion. Mediane Perfusatspiegel erreichten 15-fach höhere Konzentrationen im Vergleich zu den korrespondierenden systemischen Spiegeln (Tab.12).

Die Kathepsin B Spiegel (Abb.52) blieben im Verlauf der präanhepatischen und anhepatischen Phase konstant. Mit Reperfusion kam es zu einem exzessiven, hochsignifikanten Anstieg der Werte mit Maximum 5 Minuten nach Reperfusionsbeginn und signifikant niedrigeren Werten 10 Minuten später. 12 Stunden nach Reperfusionsbeginn waren bereits wieder präoperative Werte erreicht. Die Spiegel im Perfusat lagen weit (440-fach) über den korrespondierenden Spiegeln der systemischen Zirkulation (Tab.12).

Die Plasmawerte der EPI Komplexe (Abb.52) stiegen signifikant in der anhepatischen Phase an. Mit Reperfusion kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg bis zu Maximalwerten 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall. Die Spiegel im Perfusat waren signifikant höher (1.3-fach) als in der systemischen Zirkulation (Tab.12).

Signifikant ansteigende Aprotininspiegel (Abb.53) wurden in jeder OLT gesehen mit Maximalwerten in der frühen und späten Reperfusionsphase. Der Vergleich der Perfusatspiegel mit systemischen Werten zeigte signifikant niedrigere Aprotininspiegel im Perfusat (Abb.53).

Signifikante Korrelationen ergaben sich beim Vergleich der Verläufe von TNF, Neopterin, Elastase, EPI-Komplexen und Kathepsin B und zwischen den Spiegeln der leukozytären Mediatoren und der TAT Komplexe. Dieses galt besonders für die Reperfusionsphase (Abb.54). Korrelationen zwischen Aprotinin und leukozytären Parametern bestanden nicht.

Im Perfusat war eine signifikante Korrelation zwischen TNF Spiegeln und Neopterin und zwischen den Konzentrationen von TAT und EPI Komplexen meßbar (Abb.54).

#### **5.4.1.2. Diskussion**

Fünfzehnfach erhöhte Neopterinspiegel und 440-fach erhöhte Kathepsin B Spiegel im Perfusat gemeinsam mit einem 100%igen Anstieg der systemischen Neopterinspiegel und einem 700%igen Anstieg der systemischen Kathepsin B Spiegel mit Reperfusion der Spenderleber sprechen für eine Neopterin- und Kathepsin B-Freisetzung aus der Spenderleber, wenn arterielles Blut das partiell geschädigte endotheliale Bett der Spenderleber durchfließt (Flushing, vgl. 3.2.). Während der Konservierung der Spenderleber vor Implantation kommt es zur Schädigung der Leber (171,265,348) mit Alteration nicht nur des Leberzellendothels sondern auch der hepatischen Makrophagen und Leberzellen. So ist insbesondere bei Kathepsin B zusätzlich zur Freisetzung aus Neutrophilen am alterierten Gefäßendothel der Leber von einer intrahepatischen Freisetzung aus Hepatozyten und Makrophagen in der Reperfusionsphase auszugehen, die den extremen Anstieg der Kathepsin B Werte erklärt.

Parallel wurden leicht - aber signifikant - erhöhte Werte der EPI Komplexe und tendenziell erhöhte Konzentrationen der TAT Komplexe im Perfusat gemessen. Da im Perfusat nur die Höhe der TAT und EPI Komplexe signifikant miteinander korrelierten, ist eine Elastase-



vermittelte Prothrombinaktivierung in der Spenderleber und ein von der Spenderleber unabhängiger Anstieg von Neopterin und Kathepsin B wahrscheinlich.

In der systemischen Zirkulation konnte mit Beginn der Reperfusion ein Anstieg von Kathepsin B, EPI Komplexen, TNF und Neopterin parallel zu einem signifikanten Anstieg der TAT Komplexe gemessen werden. Auch ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen den Parametern der leukozytären Aktivierung und den TAT Komplexen. Nur Kathepsin B korrelierte nicht mit Neopterin und den TAT Komplexen. Diese Ergebnisse sprechen für eine enge Beziehung zwischen leukozytärer Aktivierung und gesteigerter Thrombinentstehung mit Beginn der Reperfusionsphase. Eine Beteiligung der leukozytären Mediatoren an den DIC-artigen Gerinnungsstörungen und am hohen Transfusionsbedarf während der Reperfusionsphase (115,119,120,275) scheint daher wahrscheinlich. Auffällig ist, daß die Korrelationen zwischen leukozytären Mediatoren und TAT Komplexen ausgeprägt in der systemischen Zirkulation und schwach im Perfusat der Spenderleber zu finden sind (Abb.54). Die Spiegel von TNF und Neopterin stiegen parallel mit Reperfusion der Spenderleber an. Die Neopterinspiegel lagen im Perfusat deutlich höher als in der systemischen Zirkulation - ein Unterschied der bei den TNF Werten nicht zu finden war. Die hohen Neopterinspiegel scheinen daher nicht TNF induziert zu sein (271), sondern sind als Ausdruck einer direkten Monozytenaktivierung zu werten.

Erhöhte TNF Werte (>100 pg/ml) am Ende der OLT scheinen einer Transplantatabstoßungsreaktion vorauszugehen (149). Die von uns untersuchten 13 Patienten zeigten keine Transplantatabstoßungsreaktionen postoperativ und die TNF Spiegel lagen nur bei 2 Patienten höher als 100 pg/ml.

Ob Aprotinin einen Einfluß auf den Verlauf leukozytärer Parameter hat, ist schwer zu beurteilen. Aus ethischen Gründen war ein Vergleich der erhobenen Daten mit einer Kontrollgruppe ohne Aprotininmedikation nicht möglich, da klinische Daten eindeutig für einen Vorteil einer intraoperativen Aprotininingabe gesprochen hatten (119,120,251). In einer Studie (284) wurden leukozytäre Parameter bei niedrig dosierter Bolusgabe und höherdosierter Infusionsgabe (s.5.2.2.1.) miteinander verglichen. Es ergab sich kein Unterschied im Verlauf der leukozytären Mediatoren zwischen beiden Dosismodalitäten (284).

#### **5.4.2. Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle und Zytokine**

Die vorherigen Ergebnisse (s.5.4.1.) hatten gezeigt, daß es insbesondere während der Reperfusion zur verstärkten Freisetzung leukozytärer Mediatoren kommt. Zur Vervollständigung dieses pathophysiologischen Ansatzpunktes prüften wir während 23 OLTs (Tab.13) ob bzw. inwieweit Zytokine (TNF, IL-6, IL-8) und Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle dabei involviert sind (142). Aprotinin wurde bei allen Transplantationen als kontinuierliche Infusion gegeben (s.5.2.2.1.).

**Tabelle 13:** Diagnose und Charakteristika von 23 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>	<b>weibl.</b>	<b>männl.</b>	<b>Alter*</b>
<b>Postnekrotische Zirrhose</b>	13	7	6	44(30-63)
<b>Primäre biliäre Zirrhose</b>	4	4	0	50(40-47)
<b>Primäre sklerotische Zirrhose</b>	3	0	3	44
<b>Akute fulminante Hepatitis</b>	1	1	0	51
<b>Leberzellcarcinom</b>	2	0	2	45,60
<b>Total</b>	23	12	11	44(30-63)

\*Median (Spannbreite) in Jahren

#### **5.4.2.1. Ergebnisse**

IL-6 Werte (Abb.55) zeigten einen hochsignifikanten Anstieg in der präanhepatischen Phase und mit Beginn und während der anhepatischen Phase. Ein erneuter hochsignifikanter Anstieg konnte in der späten Reperfusionsphase beobachtet werden gefolgt von einem signifikanten Abfall. Die Perfusatspiegel lagen hochsignifikant über den korrespondierenden systemischen Spiegel (Tab.14).

IL-8 Werte (Abb.55) stiegen erst in der Reperfusionsphase hochsignifikant an. Perfusatspiegel lagen hochsignifikant über den systemischen Spiegel (Tab.14).

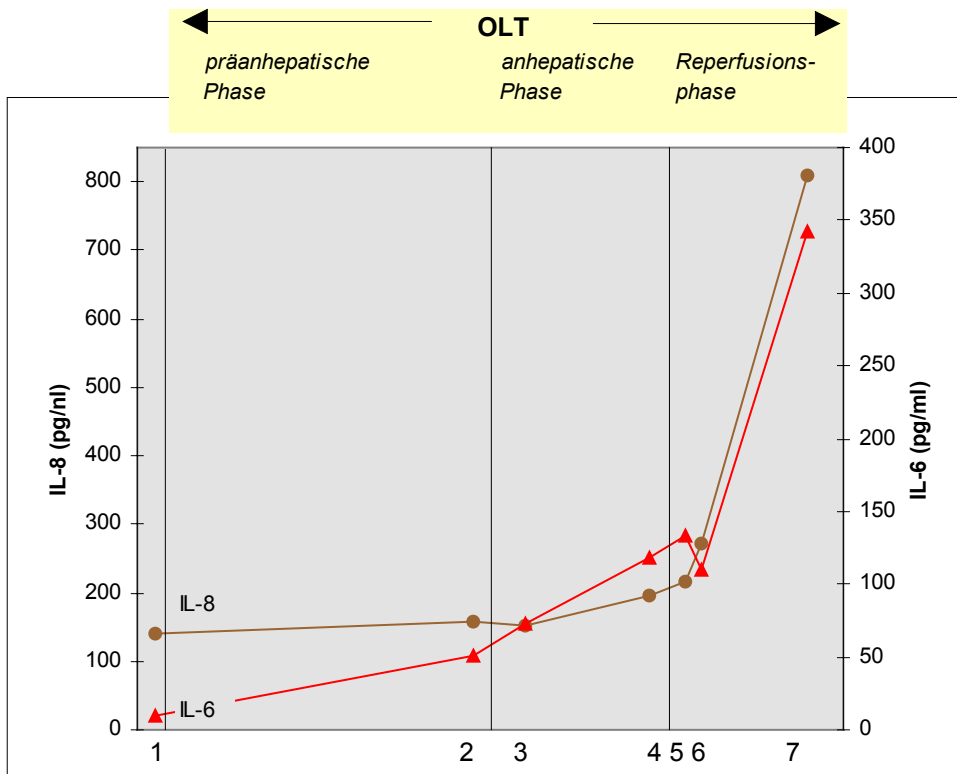
Das lösliche Adhäsionsmolekül sL-Selectin (Abb.56) fiel mit beginnender Reperfusion hochsignifikant ab gefolgt von einem signifikanten Abfall während der späteren Reperfusionsphase. Die Perfusatspiegel waren vergleichbar mit den Werten in der systemischen Zirkulation (Tab.14).

Die Spiegel des löslichen Adhäsionsmoleküls sE-Selectin (Abb.56) zeigten bis auf einen signifikanten Anstieg während der anhepatischen Phase keine weiteren Veränderungen. Die Perfusatwerte unterschieden sich nicht von den korrespondierenden systemischen Werten (Tab.14).

Die Werte des löslichen Adhäsionsmoleküls sICAM-1 (Abb.56) fielen signifikant während der anhepatischen Phase ab gefolgt von einem weiteren hochsignifikanten Abfall mit Beginn und im Verlauf der Reperfusionsphase. Die Perfusatspiegel unterschieden sich ebenfalls nicht von den systemischen Spiegel (Tab.14).

Die TAT Spiegel (Abb.57) stiegen hochsignifikant in der präanhepatischen Phase und signifikant in der anhepatischen Phase und Reperfusionsphase an. Die Perfusatwerte unterschieden sich nicht von den korrespondierenden systemischen Werten (Tab.14).

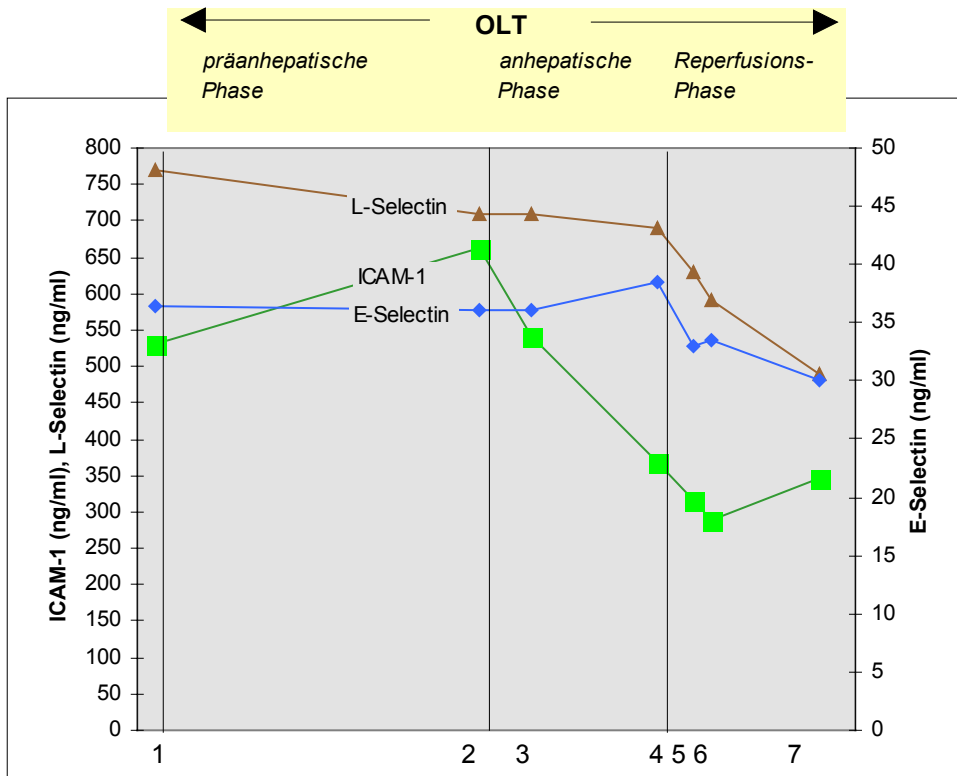
Der Verlauf des TNF (Abb.57) zeigte keine signifikanten Veränderungen während des Beobachtungszeitraumes. Erst die Werte 60 Minuten nach Reperfusion lagen signifikant höher als in der anhepatischen Phase. Die Perfusatwerte unterschieden sich nicht von den systemischen Werten (Tab.14).



**Abbildung 55:** Verlauf des Interleukin 6 (IL-6) und des Interleukin 8 (IL-8) während 23 orthotoper Lebertransplantationen.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
IL-6 (pg/ml)	2-267	0-371	13-227	18-962	16-817	19-869	17-2996
IL-8 (pg/ml)	32-3141	0-2528	41-1989	38-1559	70-6338	77-9089	37-6953

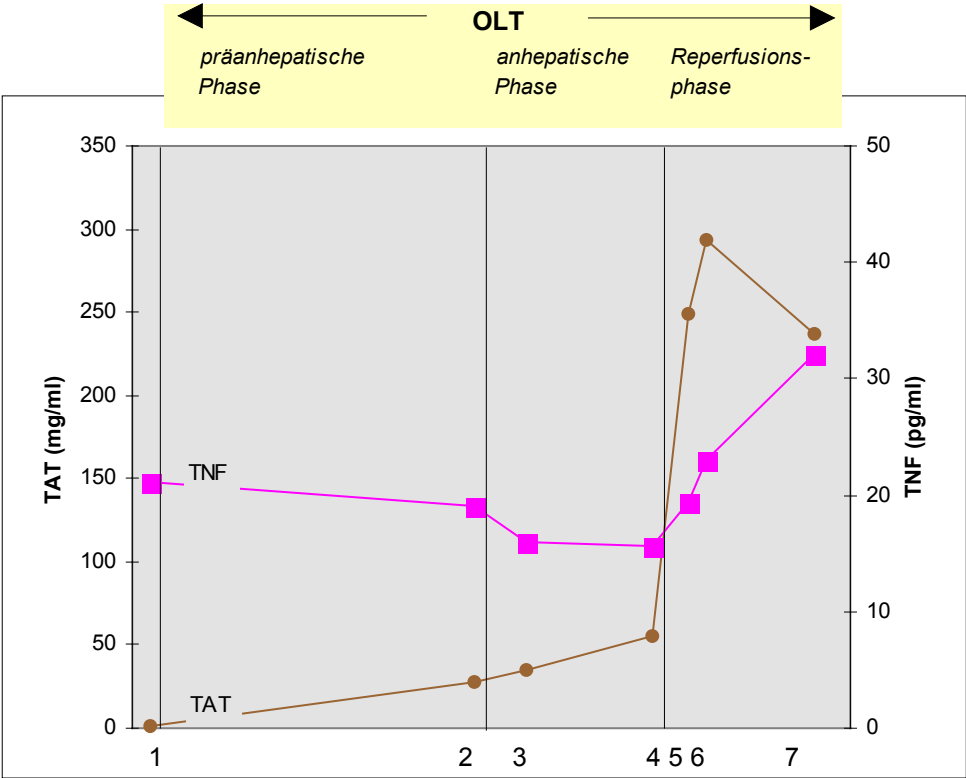
Statistische Signifikanzen						
IL-6	p(1/2)= 0.0000	p(2/3)= 0.0015	p(3/4)= 0.0001			p(6/7)= 0.0000
IL-8				p(4/5)= 0.0060	p(5/6)= 0.0001	



**Abbildung 56:** Verlauf der löslichen Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle sL-Selectin, sE-Selectin und sICAM-1 während 23 orthotoper Lebertransplantationen.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
sL-Selectin (ng/ml)	159-350	190-1350	430-1150	350-1370	320-1090	20-910	260-910
sICAM-1 (ng/ml)	173-1278	163-1336	147-1172	147-1153	111-1110	109-1161	101-1164
sE-Selectin (ng/ml)	12-126	14-112	14-92	14-96	16-78	14-76	10-78

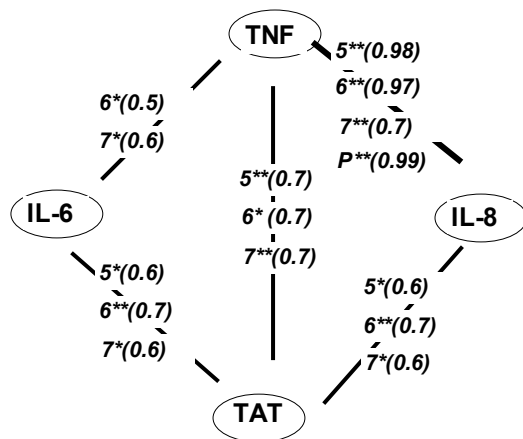
Statistische Signifikanzen							
sL-Selectin			p(4/5)=0.0064				p(6/7)=0.0458
sICAM-1		p(3/4)=0.0152	p(4/5)=0.0004	p(5/6)=0.0010			
sE-Selectin	p(2/3)=0.0401						



**Abbildung 57:** Verlauf der Thrombin-Antithrombin III Komplexe (TAT ) und des Tumornekrosefaktors (TNF) während 23 orthotoper Lebertransplantationen.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
TAT (mg/ml)	1-48	19,5-66	14,5-74	15-402	42-720	50-910	34-720
TNF (pg/ml)	10,2-99	7,4-36,2	11-118	9-29,4	3,5-447	3,6-444	21,7-377

Statistische Signifikanzen			
TAT	p(1/2)=0.0077	p(3/4)=0.0244	p(4/5)=0.05
TNF			p(4/7)=0.01



**Abbildung 58:** Korrelationen zwischen Interleukin (IL) 6, IL 8, Tumornekrosefaktor (TNF) und Thrombin-Antithrombin III Komplexen (TAT) während 23 orthotopen Lebertransplantationen (Abnahmezeitpunkt, Signifikanzniveau der Korrelation (+=tendentiell, \*=signifikant, \*\*=hoch signifikant), Korrelationskoeffizient).

**Tabelle 14:** IL-6, IL-8, TAT, TNF und Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle im Perfusat(P) und in der korrespondierenden systemischen Zirkulation zum Abnahmezeitpunkt 4 (Werte werden gegeben als Median (Spannweite))

Parameter	Perfusat	systemische Zirkulation (4)	p(P/4)
IL-6 (pg/ml)	272 (42-1347)	118 (18-962)	0.0000
IL-8 (pg/ml)	316 (45-7928)	197 (38-1559)	0.002
sL-Selectin (ng/ml)	660 (390-1210)	690 (350-1370)	n.s.
sE-Selectin (ng/ml)	38 (18-132)	33 (16-78)	n.s.
sICAM-1 (ng/ml)	400 (140-1198)	368,5 (147-1153)	n.s.
TAT (mg/ml)	66 (32,5-13000)	55 (15-402)	n.s.
TNF (pg/ml)	39,75 (2,5-1020)	15,7 (9-29,4)	n.s.

Signifikante Korrelationen (Abb.58) ergaben sich in der Reperfusionsphase zwischen den Verläufen von IL-6 bzw. IL-8 und TNF wobei insbesondere zwischen dem Verlauf von IL-8 und TNF hochsignifikante Korrelationen mit hohen Korrelationskoeffizienten bestanden. Dieses betraf auch die Perfusatwerte. Gleichzeitig bestanden in der Reperfusionsphase signifikante Korrelationen zwischen IL-6 bzw. IL-8 und den TAT Werten.

#### 5.4.2.2. Diskussion

Aktivierte Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen setzen neben lysosomalen Proteinasen (vgl. 5.4.1.) eine Reihe von pleiotrop wirksamen Zytokinen frei wie TNF, IL-6 und IL-8, die eine Abspaltung von zellgebundenen Adhäsionsmolekülen in der Zirkulation bewirken. Dieses betrifft sL-Selectin aus PMN-Granulozyten, sE-Selectin aus Endothelzellen und sICAM-1 aus Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen (159). Diese löslichen und daher im Plasma meßbaren Adhäsionsmoleküle scheinen die Funktion der zellgebundenen Adhäsionsmoleküle kompetitiv zu hemmen (258), jedoch ist ihre physiologische Bedeutung in vivo noch unklar.

Bei IL-6 und IL-8 konnte während präanhepatischer und anhepatischer Phase (IL-6) und mit Beginn der Reperfusionsphase (IL-6, IL-8) ein hochsignifikanter Anstieg beobachtet werden. Die hohe Korrelation zwischen IL-6 bzw. IL-8 und TNF im reperfusionellen Verlauf bestätigte die beschriebene TNF-abhängige Freisetzung dieser Interleukine (2,86). Darüberhinaus machte die hohe Korrelation von TNF, IL-6 und IL-8 mit den Werten der TAT Komplexe während der Reperfusionsphase die pathophysiologische Bedeutung der Zytokine bei der Induktion einer systemisch gesteigerten Prothrombinaktivierung sehr wahrscheinlich. Parallel zum Anstieg der Zytokine kam es zum Abfall der löslichen Adhäsionsmoleküle sL-Selectin und sICAM-1 wobei sE-Selectin keinen signifikanten Abfall während der OLT zeigte. Es muß beachtet werden, daß die Werte beider löslichen Selectine während des gesamten Beobachtungszeitraumes im Referenzbereich lagen. Nur die Werte von sICAM-1 lagen über dem Referenzbereich mit einer Ausnahme 15 Minuten nach Reperfusionsbeginn. Die Ergebnisse zeigten, daß es bei der OLT zu einer Aktivitätssteigerung der Zytokine (IL-6, IL-8) kommt, ohne daß diese zu einer Erhöhung der löslichen Adhäsionsmoleküle führt. Erhöhte sICAM-1 Werte lagen bereits präoperativ vor, sodaß auch hier eine durch Zytokine bedingte Abspaltung nicht wahrscheinlich scheint. Löslichen Adhäsionsmolekülen insbesondere den Selectinen kommt daher pathophysiologisch bei der erhöhten Blutungsneigung während OLT keine Bedeutung zu.

### 5.4.3. Thrombomodulin

Das lösliche sThrombomodulin wurde als endothelialer Marker und TAT Komplexe, Protein C und AT III Aktivitäten als Marker einer Prothrombinaktivierung im Perfusat und im Verlauf von 23 OLTs bestimmt (Patientenkollektiv s. Tab.13, 5.4.2.) (139).

#### 5.4.3.1. Ergebnisse

Präoperative mediane sThrombomodulinspiegel (Abb.59) lagen deutlich über den Normalwerten (2). Sie blieben stabil während der präanhepatischen und beginnenden anhepatischen Phase mit leichtem - aber signifikantem - Anstieg am Ende der anhepatischen Phase. Mit Beginn der Reperfusionsphase kam es zu einem 2-fachen Anstieg der Werte mit Maximum 5 Minuten nach Beginn der Reperfusionsphase gefolgt von einem signifikanten Abfall 10 Minuten später. Im Perfusat lagen die sThrombomodulinwerte hochsignifikant über den Werten der korrespondierenden systemischen Zirkulation.

TAT Spiegel (Abb.60) zeigten einen signifikanten Anstieg in der anhepatischen Phase gefolgt von einem ausgeprägteren Anstieg mit beginnender Reperfusion. Die Perfusatspiegel lagen hochsignifikant über den systemischen Spiegel. Die Gerinnungsinhibitoren AT III und Protein C (Abb.60) zeigten beide einen signifikanten Abfall mit beginnender Reperfusion und einen Anstieg 15 bis 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion. Die Perfusatspiegel lagen bei beiden Parametern niedriger im Vergleich zur systemischen Zirkulation.

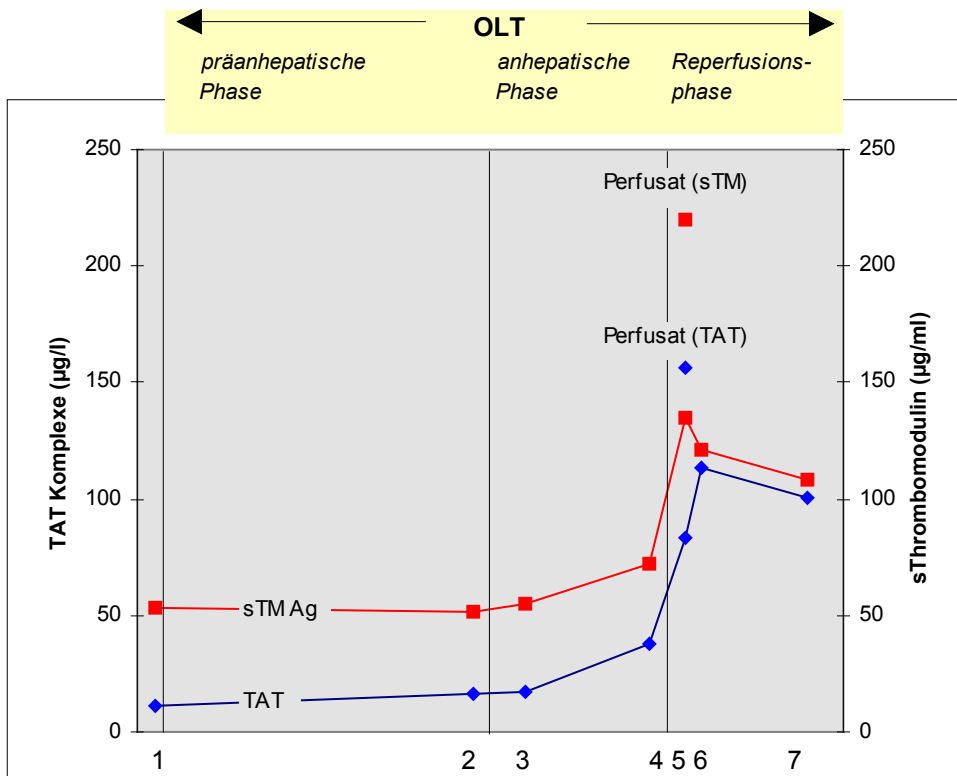
#### 5.4.3.2. Diskussion

Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine leukozytäre Aktivierung und eine ausgeprägte Prothrombinaktivierung systemisch mit beginnender Reperfusion und im Perfusat. Der Schädigung des vaskulären Bettes der Spenderleber scheint kausale Bedeutung bei diesen Aktivierungsprozessen zuzukommen.

sThrombomodulin hat sich in vitro als Marker einer endothelialen Schädigung erwiesen (153), und es wurde beschrieben, daß Plasmaspiegel von sThrombomodulin bei verschiedenen Erkrankungen erhöht sind, die mit Endothelzellschädigung oder proteolytischer Aktivität an der Oberfläche der Endothelzellen assoziiert sind (DIC (318,319), ARDS (adult respiratory distress syndrome) (319), thromboembolischen Erkrankungen (318,319), thrombotisch thrombozytopenische Purpura (317,343), Diabetes mellitus mit Mikroangiopathie (318,319,320), systemischer Lupus erythematoses (167), chronisch myeloische Leukämie (235)).

Die präoperativ erhöhten sThrombomodulinwerte und die ansteigenden Werte in der anhepatischen Phase sind erklärbar durch die verminderte hepatische Clearance präoperativ bei Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung und das Fehlen dieser Funktion in der anhepatischen Phase. Der rasche Anstieg mit Reperfusion der Spenderleber, der in den Maximalwerten 2-fach über den präreperfusionellen Werten lag und vor allem die deutlich erhöhten sThrombomodulinwerte im Perfusat sprechen für eine Freisetzung von sThrombomodulin aus der Spenderleber. Die Schädigung des Endothels der Spenderleber während der kalten Ischämiezeit ist hier sicherlich von primärer Bedeutung (Kapitel 5.4.1., 5.4.2., 5.6.; 119,120,125).





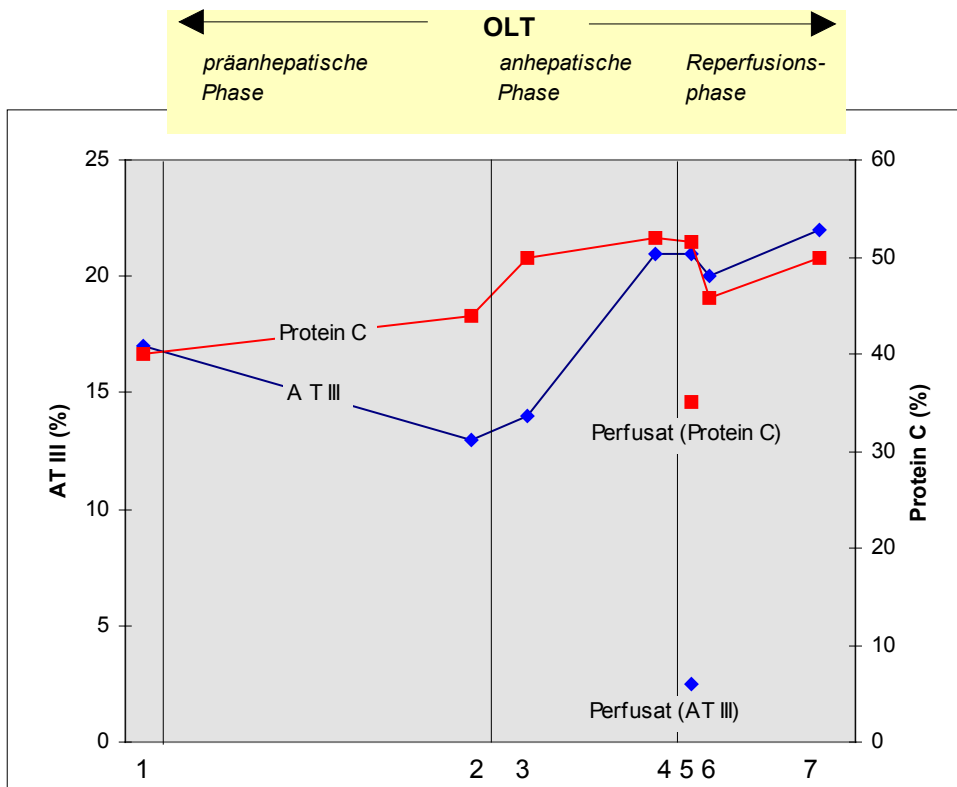
**Abbildung 59:** Konzentrationen von löslichem Thrombomodulin (sTM) und Thrombin-Antithrombin III Komplexen (TAT) im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen und im Perfusat (P).

#### Spannweiten

Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
sTM (µg/ml)	10-140	14-150	8-140	20-163	30-398	35-310	35-175	50-750
TAT (µg/l)	1-50	2,8-66	11,2-93	15,7-381	26-800	36-925	35,8-710	32,5-1300

#### Statistische Signifikanzen

sTM	p(3/4)=0.03	p(4/5)=0.001	p(5/6)=0.01	p(4/P)=0.001
TAT	p(3/4)=0.004	p(4/5)=0.0001	p(5/6)=0.0006	p(4/P)=0.0001



**Abbildung 60:** Aktivitäten von Antithrombin III (AT III) und Protein C im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen und im Perfusat (P).

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
AT III (%)	11-123	13-103	9-103	16-101	15-109	14-91	16-119	15-96
Protein C (%)	2,5-110	2,5-70	2,5-62	5-79	6-65	6-55	9-51	2,5-29

Statistische Signifikanzen				
AT III	p(4/5)=0.03	p(5/6)=0.004	p(6/7)=0.005	p(4/P)=0.0001
Protein C		p (5/6)=0.04	p(6/7)=0.02	p(4/P)=0.0001

Die Zeichen der vorbeschriebenen Prothrombinaktivierung (119,120) während der Reperfusionsphase mit hohen Spiegeln der TAT Komplexe und erniedrigten AT III und Protein C Werten systemisch und im Perfusat zeigten einen parallelen Verlauf zur sThromboglobulinfreisetzung und machen daher eine direkte Verbindung wahrscheinlich. Es ist jedoch auch möglich, daß beide Phänomene durch die gleiche Ursache, wie intrahepatischen Endothelzellschaden, induziert wurden. Ob leukozytäre Aktivierungsprodukte insbesondere die Proteolyse durch Elastase und/oder anderer Proteasen eine Rolle spielen, ist zu diskutieren (235).

## **5.5. Bedeutung der Thrombozytenfunktion während orthotoper Lebertransplantation**

### **5.5.1. Untersuchungen der Thrombozytenfunktion während orthotoper Lebertransplantation**

Bei 10 Patienten wurden in einer konsekutiven Serie (125) Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion während Lebertransplantation durchgeführt (Tab.10, s.5.3.) (132). Intraoperativ wurden EK und FFP jedoch keine Thrombozytenkonzentrate gegeben. Das intraoperative Management unterschied sich nicht von den Voruntersuchungen. Aprotinin wurde als kontinuierliche Infusion gegeben (s.5.2.2.1.).

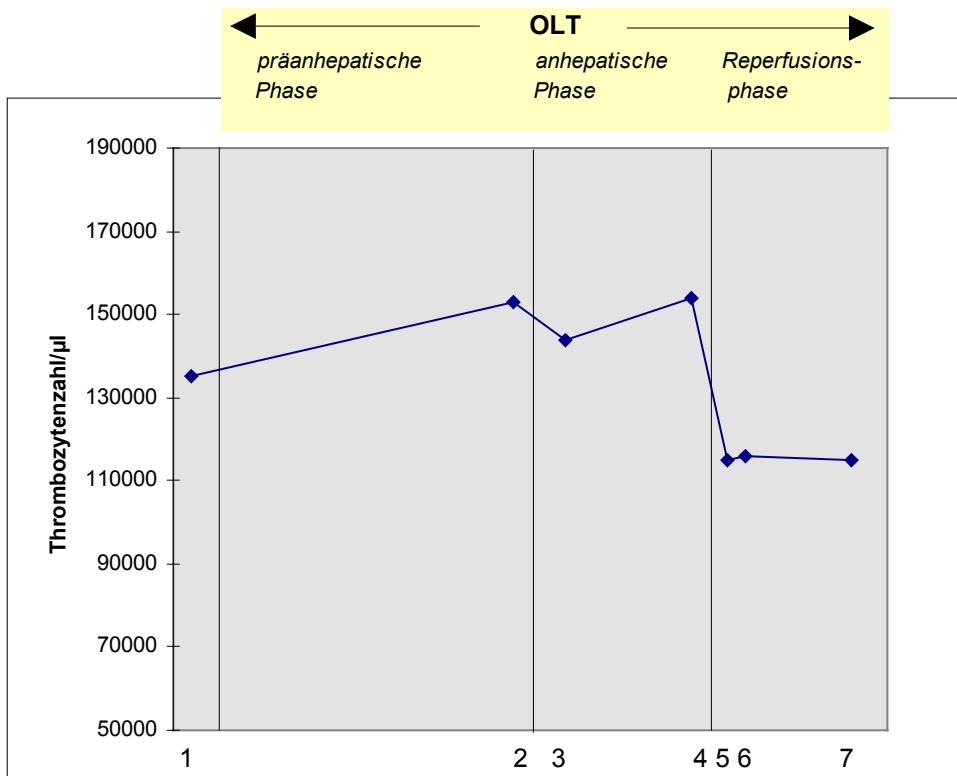
#### **5.5.1.1. Ergebnisse**

Der mediane EK Bedarf (Spannweite) betrug 6 (4-8) Einheiten, die FFP Transfusionen 8 (4-16) Einheiten und die Plättchenzahl des unverdünnten plättchenreichen Plasmas lag bei 116000 (37000-246000)/ $\mu$ l. Niedrige Plättchenzahlen im PRP beeinflussten die Aggregabilitätsmessungen bei den verschiedenen Agentien in unterschiedlichem Ausmaß. Die Kollagen-induzierte Aggregation bei arteriellen Proben konnte aus diesem Grund bei einer, die ADP-induzierte Aggregation bei keiner, die Ristocetin-induzierte Aggregation bei zwei und die Arachidonsäure-induzierte Aggregation bei sechs OLTs nicht gemessen werden.

Mit Reperfusion der Spenderleber konnte ein signifikanter Abfall der Thrombozytenzahl beobachtet werden (Abb.61). Die Kollagen-induzierte Aggregationsfähigkeit war gleichbleibend während präanhepatischer und anhepatischer Phase. Unmittelbar mit Beginn der Reperfusion kam es zum Absinken der MA (Abb.62,63). Bei der ADP-getriggerten Plättchenaggregation kam es zu einem deutlichen Abfall der MA mit Reperfusion, während auch hier in präanhepatischer und anhepatischer Phase keine Veränderungen gesehen werden konnten (Abb.62,64). Die MA der Ristocetin-induzierten Plättchenaggregation lag signifikant niedriger nach Reperfusion im Vergleich zu anhepatischen Werten (Abb.62,65). Bei der Arachidonsäure-induzierten thrombozytären Aggregationsfähigkeit zeigte sich ein postreperfusioneller Abfall, der jedoch kein Signifikanzniveau erreichte (Abb.66).

#### **5.5.1.2. Diskussion**

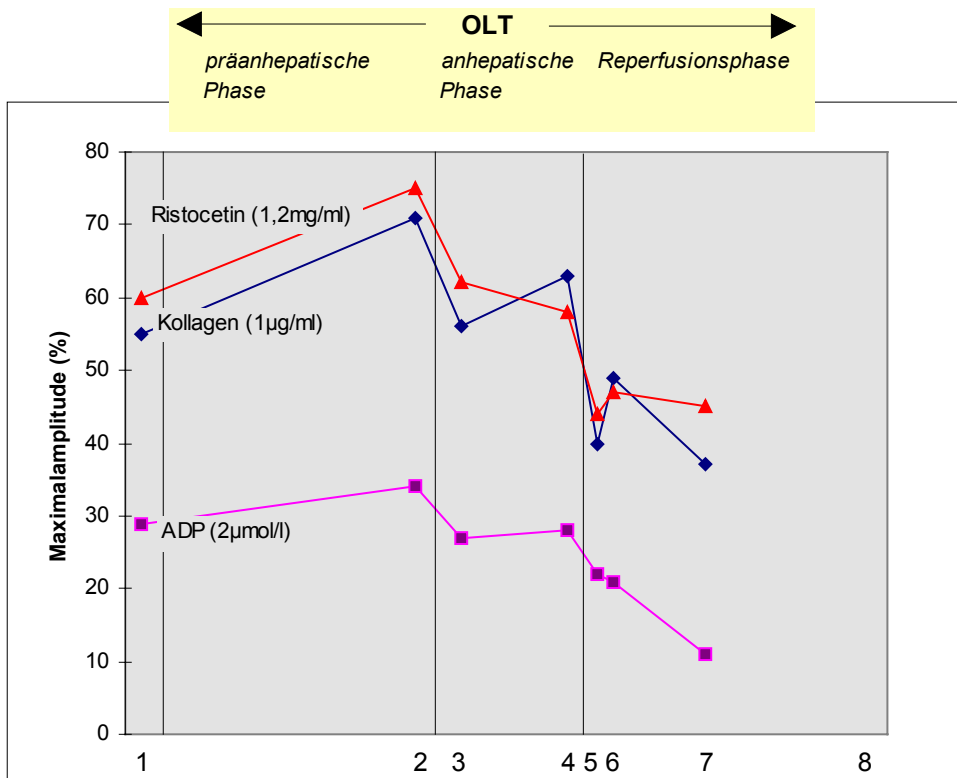
Die vorliegende Untersuchung zeigte den Verlauf der Thrombozytenzahl und Aggregabilität während 10 OLTs. Mit Perfusion der Spenderleber kam es - wie vorbeschrieben (146,267) - zu einem signifikanten Abfall der Plättchenzahl. Dieser ist im Rahmen der postreperfusionellen gesteigerten Gerinnungsaktivierung (115,119,120,275) mit gleichzeitigem Anstieg der TAT Komplexe und Fibrinmonomere und Abfall der Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen, vWF Ag) und Inhibitoren (AT III, Protein C, Protein S) zu interpretieren, wie spätere Untersuchungen bestätigten (281). Es wird außerdem eine Sequestration der Empfängerthrombozyten in der Spenderleber als Ursache für den postreperfusionellen Thrombozytenabfall vermutet (146,267). Hutchinson et al. (146) fanden in Hundelebertransplantationen Hinweise auf eine Verlagerung der Thrombozyten in den Disseraum, während Cossel et al. (63) eine Phagozytose der Thrombozyten durch Kupfferzellen für wahrscheinlich hielten. Spätere Untersuchungen konnten diese Ergebnisse bei 18 Schweinelebertransplantationen bestätigen (273). Trotzalledem ist der genaue pathophysiologische Mechanismus des intraoperativen Thrombozytenabfalls noch unzureichend geklärt.



**Abbildung 61:** Verlauf der Thrombozytenzahl während 10 orthotoper Lebertransplantationen.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
Thrombozytenzahl/μl	40.000- 266.000	89.000- 208.000	71.000- 227.000	69.000- 246.000	49.000- 242.000	37.000- 252.000	27.000- 233.000

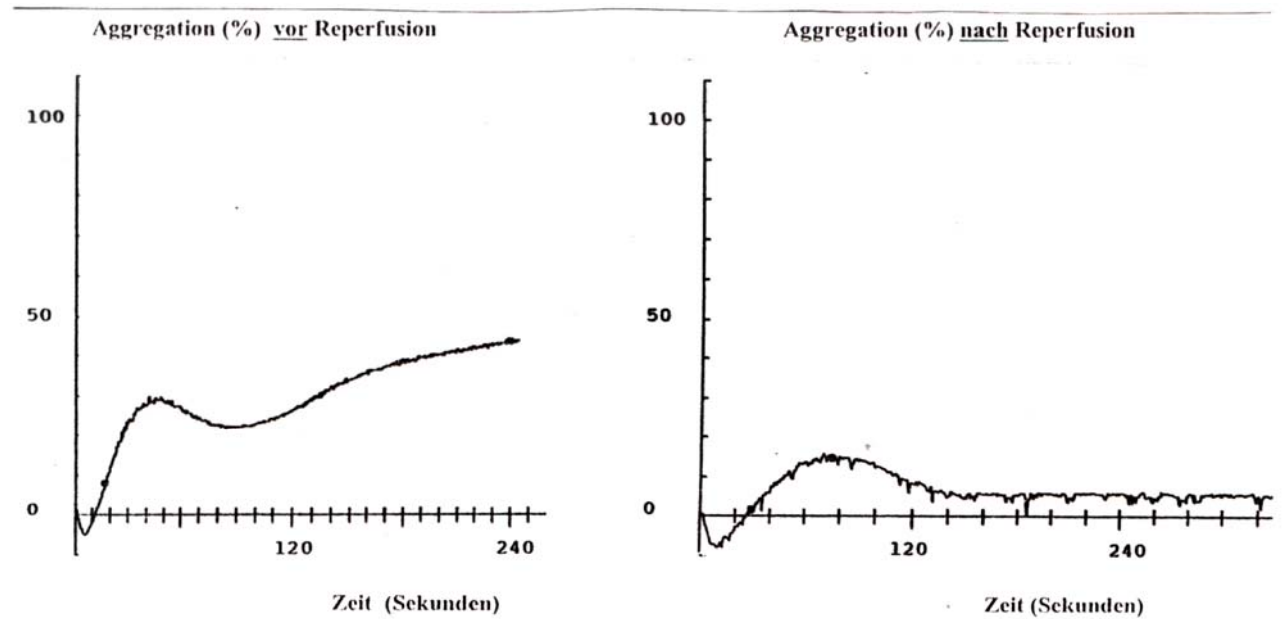
Statistische Signifikanzen			
Thrombozytenzahl	p(4/5)=0.008	p(4/6)=0.011	p(4/7)=0.033



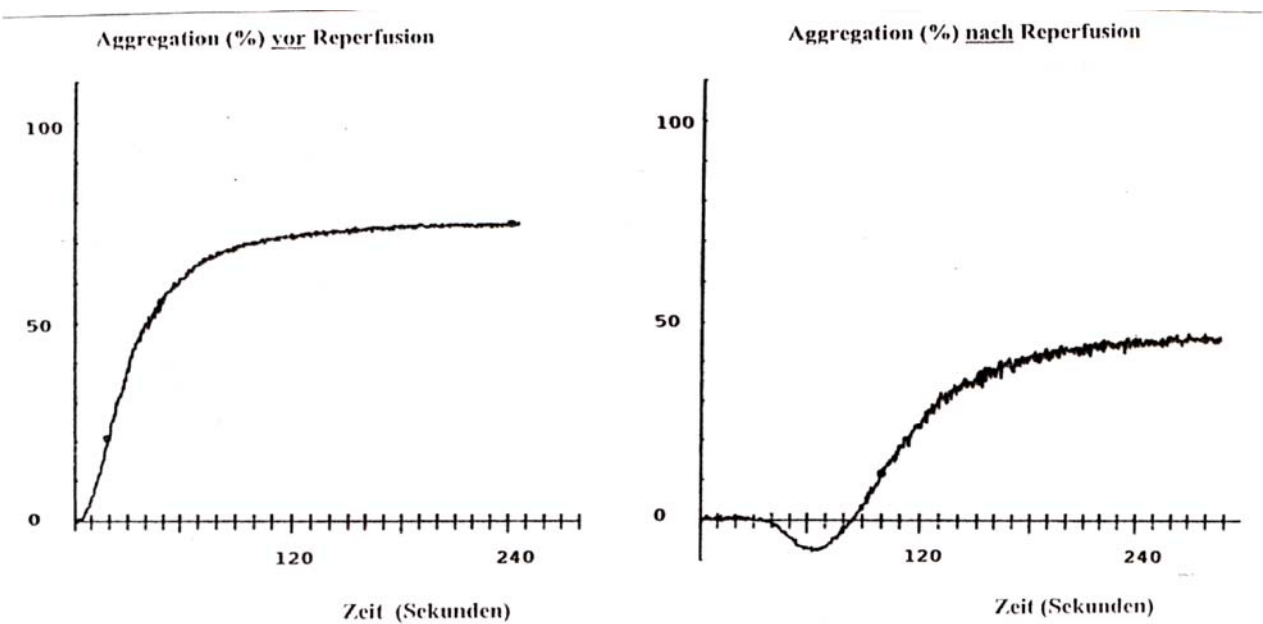
**Abbildung 62:** Kollagen-, Adenosindiphosphat (ADP)- und Ristocetin-induzierte Aggregationsfähigkeit im Verlauf von 10 orthotopen Lebertransplantationen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
MA-Kollagen (%)	30-87	42-89	0-88	0-89	0-83	0-93	0-87	0-77
MA-ADP (%)	4-81	19-83	3-78	0-74	0-51	0-45	0-74	0-73
MA-Ristocetin (%)	0-80	23-95	0-92	0-93	0-84	0-87	12-101	0-100

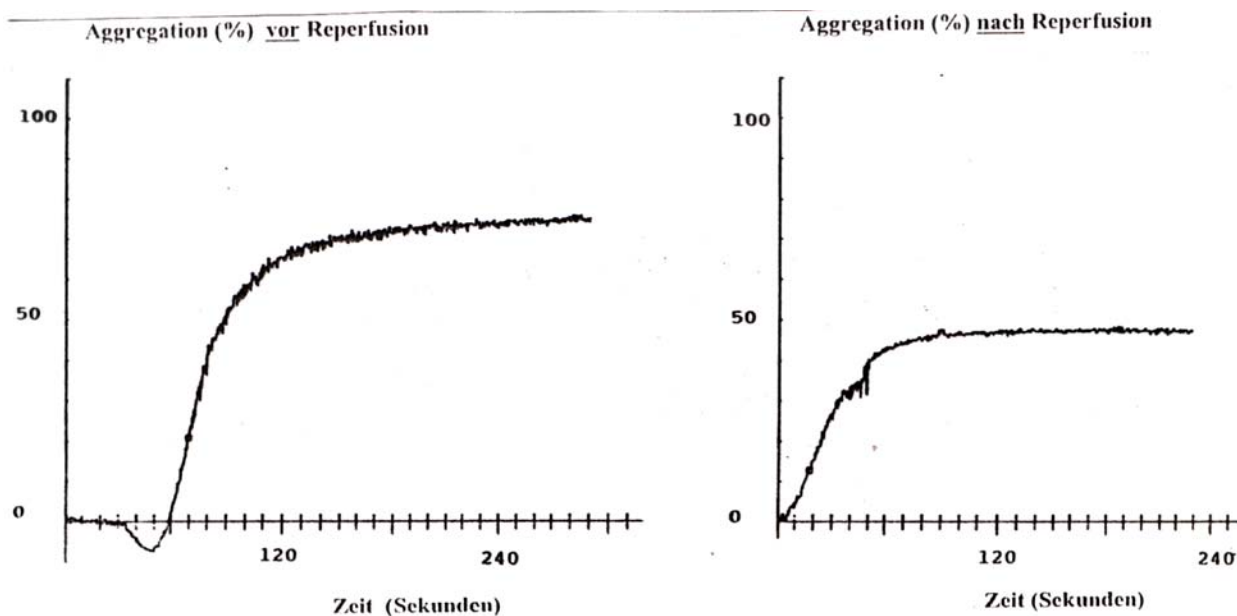
Statistische Signifikanzen			
Kollagen	p(4/5)=0.018	p(4/6)=0.046	p(4/7)=0.064
ADP	p(4/5)=0.046	p(4/6)=0.006	
Ristocetin	p(4/5)=0.014	p(4/6)=0.084	



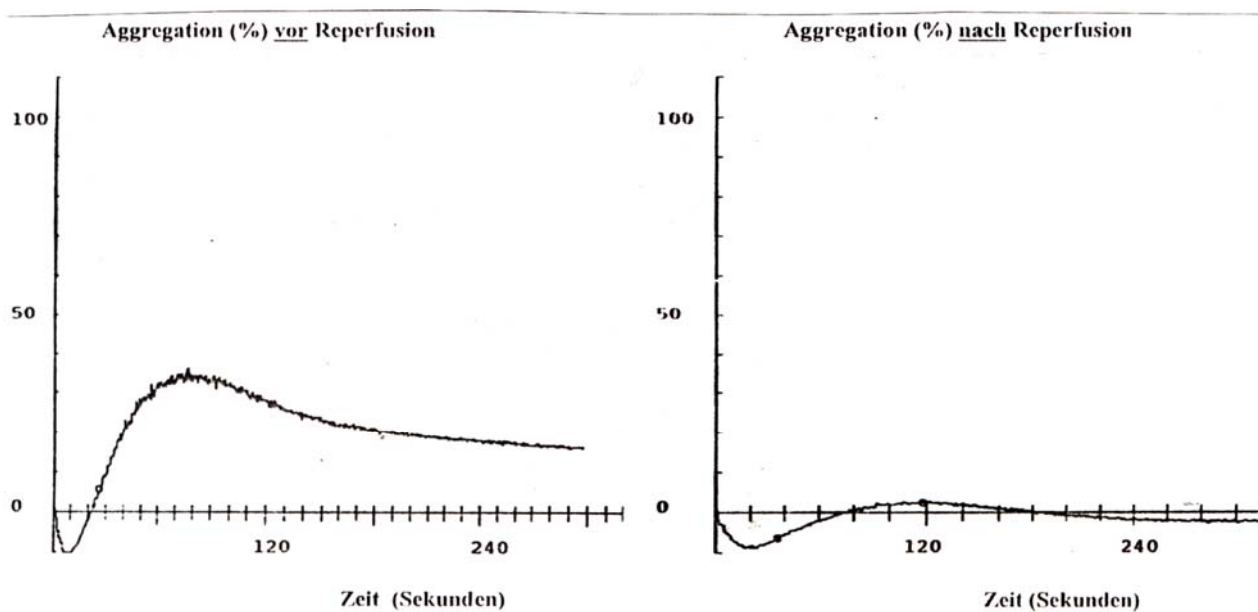
**Abbildung 63:** Verlauf einer Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationskurve vor und nach Reperfusionsbeginn bei orthotoper Lebertransplantation.



**Abbildung 64:** Verlauf einer ADP-induzierten Thrombozytenaggregationskurve vor und nach Reperfusionsbeginn bei orthotoper Lebertransplantation.



**Abbildung 65:** Verlauf einer ADP-induzierten Thrombozytenaggregationskurve vor und nach Reperfusionsbeginn bei orthotoper Lebertransplantation.



**Abbildung 66:** Verlauf einer Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationskurve vor und nach Reperfusion bei orthotoper Lebertransplantation.



Parallel zu der Abnahme der Thrombozytenzahl mit beginnender Reperfusionphase konnte eine deutliche Abnahme der Kollagen-, ADP- und Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation gemessen werden, die meist 60 Minuten nach Reperfusion noch nachweisbar war (Abb.62). Bei der Arachidonsäure-getriggerten Aggregation zeigte sich in den Fällen, in denen eine Aggregation gemessen werden konnte, ein ähnliches Bild (Abb.62e), jedoch konnte aufgrund der geringen Fallzahl kein Signifikanzniveau erreicht werden.

Die Spenderleber wird bis kurz vor Implantation in einer kalten Konservierungslösung gelagert. Es ist anzunehmen, daß es während dieser kalten Ischämiezeit zu einer intrahepatischen Gefäßendothelverletzung kommt. Es entsteht freiliegendes Subendothelium. Mit Reperfusion der Spenderleber passiert Empfängerblut das alterierte Gefäßendothel der Spenderleber. Es kommt dort zu verstärkter Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung mit Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten. Der Abfall von Thrombozytenzahl und thrombozytärer Aggregationsfähigkeit des Blutes nach Verlassen des Spenderorgans wird dadurch verständlich.

Bei Herzoperationen mit kardiopulmonalem Bypass war ebenfalls wiederholt eine thrombozytäre Dysfunktion beobachtet worden (114). Untersuchungen von Wenger et al. (351) hatten gezeigt, daß der Kontakt der Thrombozyten mit der Fremdoberfläche des Bypasses zu einem Verlust der Glykoproteine auf der Plättchenoberfläche führt (37,65,79,355). Dieser Pathomechanismus scheint bei dem veno-venösen Bypass in der anhepatischen Phase der OLT eine untergeordnete Rolle zu spielen, da während dieser Zeit kein Abfall der thrombozytären Aggregationsfähigkeit zu messen war. Wildevuur et al. (355) konnten zeigen, daß Aprotinin die Fähigkeit besitzt, die Ib-Rezeptorfunktion der Glykoproteine auf der thrombozytären Oberfläche zu erhalten. Dieses wird zum Teil durch die Aprotinin-bedingte Plasminhemmung erklärt (355). Bei den Ergebnissen ist zu diskutieren, ob ein veno-venöser Bypass im Gegensatz zum kardiopulmonalen Bypass den Rezeptorstatus der Thrombozyten geringfügiger alteriert oder ob die Aprotinin-Infusion den Verlust von Oberflächenrezeptoren erfolgreich verhindert hat. Die gleiche Aprotininingabe scheint jedoch mit beginnender Reperfusionphase bei Aktivierungsprozessen an der ischämisch geschädigten Gefäßwand der Spenderleber nicht auszureichen, um thrombozytäre Aktivierungsprozesse zu verhindern.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß postreperfusionell neben Störungen im Fibrinolyse- und Hämostasesystem auch eine herabgesetzte thrombozytäre Aggregationsfähigkeit zur erhöhten Blutungsneigung bei OLT führt.

Zeitgleich mit Verminderung der thrombozytären Aggregabilität bei Beginn der Reperfusionphase gelangt Konservierungslösung in die systemische Zirkulation des Empfängers, und es erscheint prüfenswert, ob zwischen beiden Phänomenen ein kausaler Zusammenhang besteht.

### **5.5.2. Einfluß verschiedener Konservierungsflüssigkeiten auf die Thrombozytenaggregabilität in vitro**

In vitro wurde der Einfluß verschiedenener Konservierungslösungen (Tab.15) auf die ADP-, Kollagen- und Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP von 4 gesunden

Probanden geprüft (109,121,122).

**Tabelle 15:** Zusammensetzung der UW-, Bretschneider und Euro-Collinslösung

Belzer UW-CSS Lösung	Euro-Collinslösung	Bretschneiderlösung
Raffinose (30mM)	Glukose (194mM)	KHC <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
K-Lactobionat (100 mM)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15mM)	Mannit (30mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (25 mM)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (42mM)	KCl (9mM)
HES (5g%)	NaHCO <sub>3</sub> (10mM)	MgCl x 6H <sub>2</sub> O (4mM)
MgSO <sub>4</sub>	KCl (15mM)	NaCl (15mM)
Adenosin (5mM)		Histidin (180mM)
Glutathion (3mM)		Histidin x HCl x H <sub>2</sub> O (18 mM)
Allopurinol (1mM)		Tryptophan (2mM)
Insulin (40 Einheiten)		
Penicillin G (200000 Einheiten)		
Dexamethason (16mg)		

**Tabelle 16:** Thrombozytenaggregation gemessen als Maximalamplitude in plättchenreichem Plasma mit definierter Thrombozytenzahl (PRP) von vier gesunden Probanden (1-4) bei Zusatz von Natriumchloridlösung (0,9% NaCl), Bretschneider- und Euro-Collinslösung

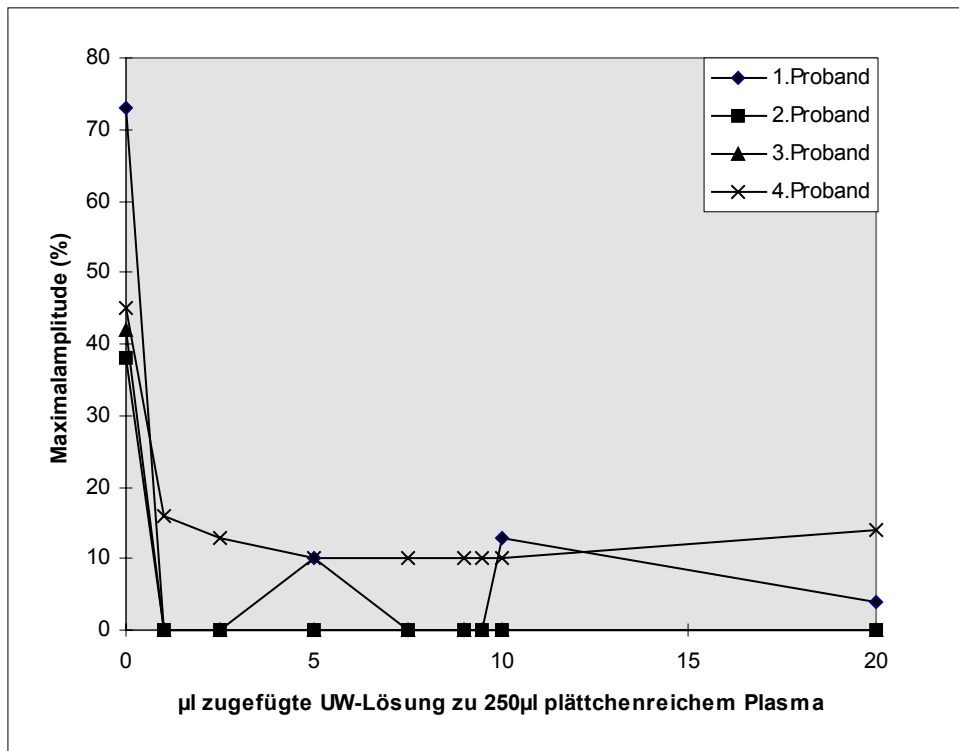
	Kollagen (1µg/ml)				ADP (2µg/l)				Ristocetin (1,2mg/ml)			
250µl PRP +	Maximalamplitude (%)											
Proband Nr.	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20µl NaCl	79	84			75	80			67	58		
20µl Euro-Collinslösung	80	82			74	79			70	60		
20µl Bretschneiderlösung.	82	87			72	82			69	54		
10µl NaCl Lösung	88	91	89	81	73	38	37	44	66	67		
10µl Euro-Collinslösung	80	92	83	80	69	38	38	38	64	69		
10µl Bretschneiderlösung	82	89	93	82	73	34	42	36	68	69		

### 5.5.2.1. Ergebnisse

Die MA der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation war nach Zusatz kleinster Mengen UW-Lösung deutlich reduziert. Eine Dosisabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden. Schon ein Zusatz von 0,5µl UW-Lösung zu 250µl PRP hemmte die Thrombozytenaggregation (Abb.67).

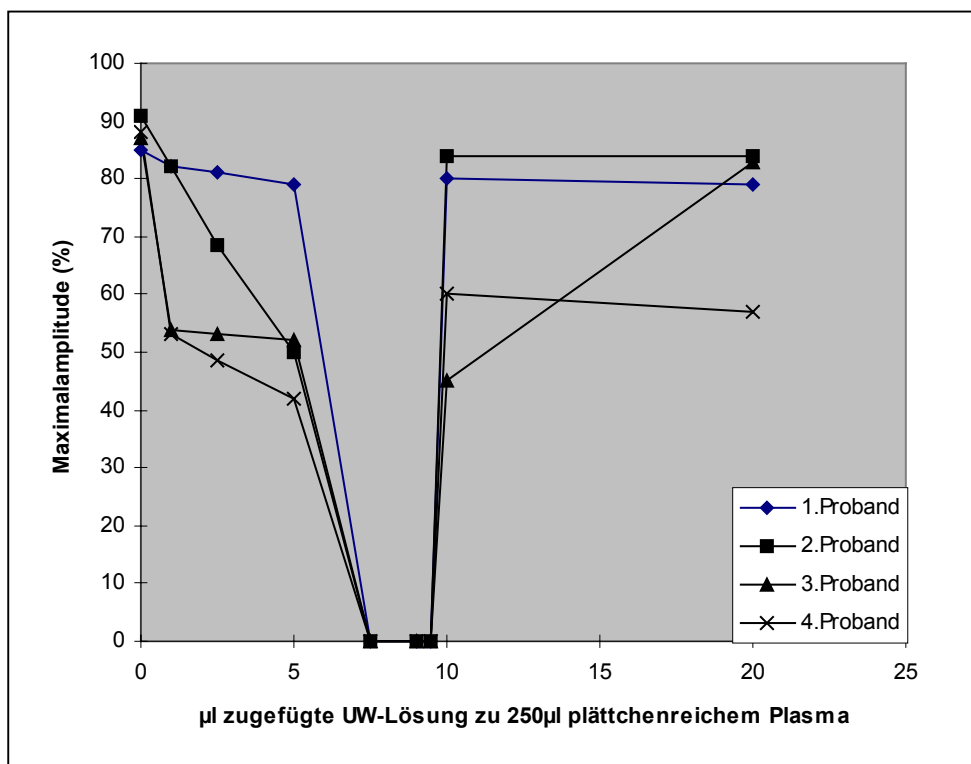
Bei der Kollagen-getriggerten Thrombozytenaggregation (Abb.68a)) kam es zu einer zweiphasigen Aggregationskurve bei Zusatz der UW-Lösung. Die Gabe von 5-10µl UW-Lösung führte zu einer dosisabhängigen Verminderung der MA. Bei größerem Zusatz von UW-Lösung wurde ein Anstieg der MA gesehen. Die Lag-Phase (Abb.68b), s.3.3.3.) verhielt sich analog zur MA mit Verlängerung bis zu einem Zusatz von 10µl UW-Lösung und anschließender Verkürzung bei Zugabe größerer Mengen. Die Ristocetin-induzierte Aggregation (Abb.69) war nicht durch Zugabe der UW-Lösung beeinflusst.

Die Zugabe verschiedener Mengen Kochsalzlösung, Euro-Collins- und Bretschneiderlösung zu PRP führte zu keiner Veränderung der Thrombozytenaggregation (Tab.15). Die Zugabe

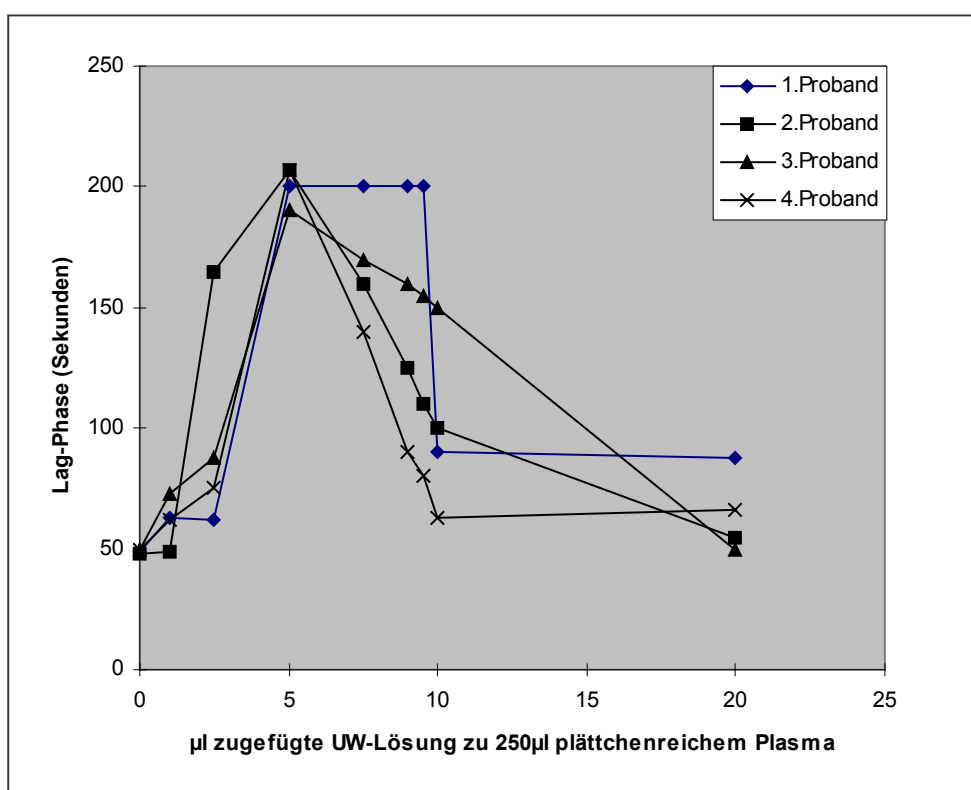


**Abbildung 67:** ADP-induzierte Thrombozytenaggregation gemessen als erreichte Maximalamplitude in der Aggregationsantwort bei Zusatz ansteigender Mengen von UW-Lösung (University of Wisconsin Konservierungslösung) unter Verwendung von Plasma vier gesunder Probanden.

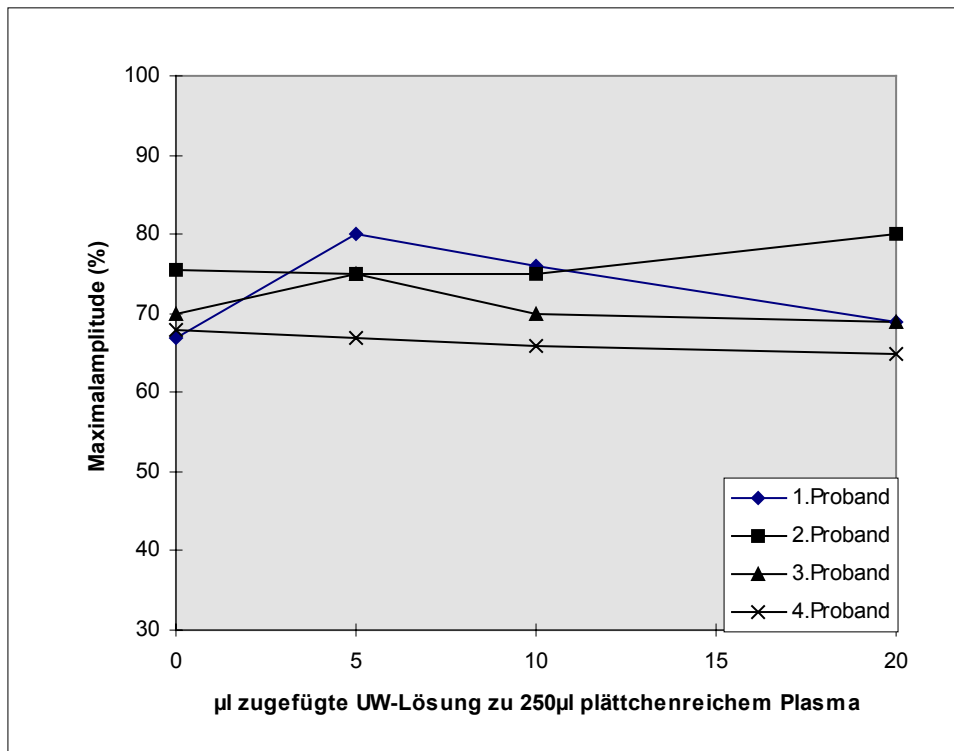
a)



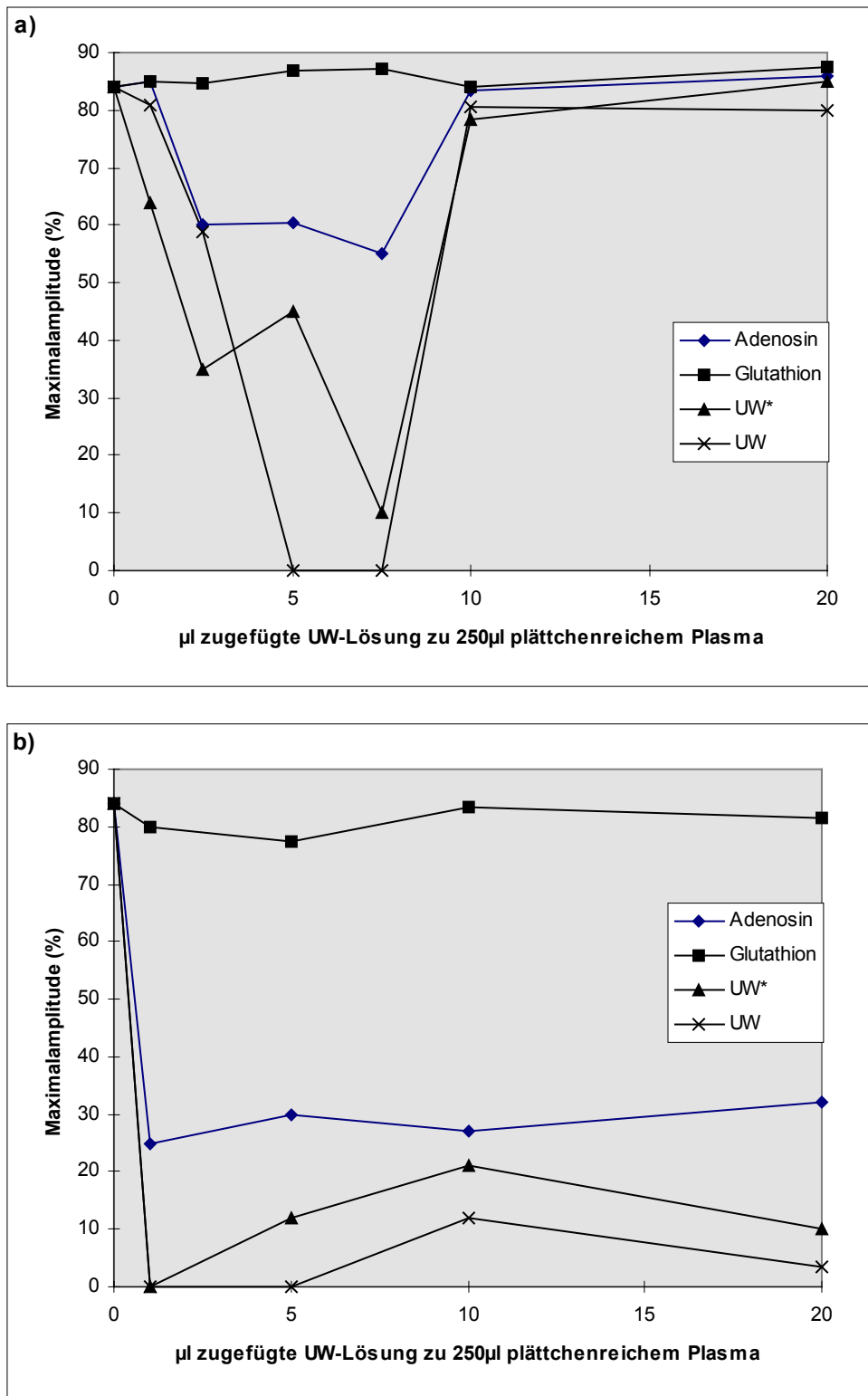
b)



**Abbildung 68:** Bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation wurde unter Verwendung von Plasma vier gesunder Probanden a) die erreichte Maximalamplitude in der Aggregationsantwort gemessen und b) die Lag-Phase bei Zusatz ansteigender Mengen von UW-Lösung (University of Wisconsin Konservierungslösung) bestimmt.



**Abbildung 69:** Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation gemessen als erreichte Maximalamplitude in der Aggregationsantwort bei Zusatz ansteigender Mengen von UW-Lösung (University of Wisconsin Konservierungslösung) unter Verwendung von Plasma vier gesunder Probanden.



**Abbildung 70:** Kollagen (a)- und ADP (b)-induzierte Thrombozytenaggregation gemessen als erreichte Maximalamplitude in der Aggregationsantwort bei Zusatz ansteigender Mengen von UW-Lösung (University of Wisconsin Konservierungslösung), UW-Lösung\* (UW-Lösung ohne Zusatz von Penicillin, Dexamethason und Insulin), Adenosin (5mM) und Glutathion (3mM).

von UW\*-Lösung, eine UW-Lösung ohne Penizillin, Dexamethason und Insulin, führte zu einer leichten Verminderung der Thrombozytenaggregation (Abb.66a). Bei Adenosinzusatz (5mM) kam es ebenfalls zur Verminderung der Thrombozytenaggregation, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Zusatz von UW- oder UW\*-Lösung. Glutathionzugabe (3mM) beeinflusste die Plättchenaggregation (Abb.70b) nicht.

#### 5.5.2.2. Diskussion

Die Entwicklung der UW-Konservierungslösung (344) führte zur Verbesserung der Organkonservierung mit Verlängerung der kalten Ischämiezeit des Transplantationsorgans im Tiermodell und in der humanen OLT (1,154,163,259,328,344). Eine höhere Überlebensrate der Patienten und eine niedrigere Inzidenz hepatischer arterieller Thromben konnte beobachtet werden (328,329).

Die Ergebnisse zeigten, daß im Gegensatz zu isotoner Natriumchloridlösung, Euro-Collinslösung und Bretschneiderlösung der Zusatz von UW-Lösung zu PRP in vitro die Thrombozytenaggregation hemmt. Während die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation schon durch kleinste Mengen UW-Lösung gehemmt wurde, zeigte die Kollagen-getriggerte Aggregation ein biphasisches Bild bei steigender Menge zugesetzter UW-Lösung. Die Ristocetin-induzierte Aggregation wurde von der UW-Lösung nicht beeinflusst.

Die Untersuchungen der UW\*-Lösung und einzelner Komponenten der UW-Lösung ergaben, daß die Hemmung der Plättchenaggregation vor allem durch das Adenosin verursacht wurde. Das gesamte Hemmpotential der UW-Lösung war jedoch größer als die Adenosin-bedingte Hemmung. Die reduziertere Aggregationshemmung der UW\*-Lösung im Vergleich zur UW-Lösung läßt vermuten, daß die fehlenden Komponenten der UW\*-Lösung (Penizillin, Dexamethason, Insulin) mitverantwortlich an der Aggregationshemmung waren. Für Penizillin wurde bereits eine plättchenaggregationshemmende Eigenschaft vorbeschrieben (45,298). Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch die UW-Lösung scheint daher im wesentlichen durch Adenosin und Penizillin bedingt zu sein.

Die Adenosinkonzentration der vorliegenden in-vitro Untersuchung (0.01-0.4mMol/l) war vergleichbar mit der postulierten in-vivo Situation (119,122). Diese Zahlen müssen durch die Tatsache korrigiert werden, daß während der Konservierung der Spenderleber ein Teil des Adenosins in Inosin, Hypoxanthin und Xanthin überführt wird. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß Störungen der Plättchenaggregation durch bestimmte Agentien in-vivo weit niedrigere Konzentrationen benötigen als in-vitro (148).

Mit Revaskularisierung der Spenderleber mischt sich UW-Lösung mit dem in die Spenderleber einströmenden Blut und gelangt nach Eröffnung der V.cava-Anastomose in die systemische Zirkulation. Es ist vorstellbar, daß die Verminderung der Thrombozytenaggregation mit Beginn der Reperfusionsphase durch Einwirkung der UW-Lösung mitbedingt ist. Zusätzlich zur - bei den meisten Patienten bereits präoperativ bestehenden - Thrombozytopenie und den geschilderten (s.Kapitel 4, 5.2., 5.3.) Störungen der plasmatischen Gerinnung und Fibrinolyse kann dies die erhöhte Blutungsbereitschaft in der Reperfusionsphase entscheidend bestimmen. Die Zusammensetzung der UW-Lösung ist komplex, und es wurde versucht, die Notwendigkeit einzelner Komponenten zu bestimmen. Adenosin wurde der UW-Lösung zur Stimulation der ATP-Resynthese zugesetzt. Ex-vivo zeigte sich an einem isoliert perfundierten Kaninchenlebermodell, daß das Weglassen von Adenosin zu keiner großen Störung der Leberfunktion und Verminderung der

Gallenflüssigkeit führte (314), während dies bei Weglassen von Raffinose und Glutathion der Fall war (154). Ob es sinnvoll ist, die UW-Lösung ohne den Adenosinanteil herzustellen, ist zu diskutieren. Die Aggregationshemmung durch die UW-Lösung kann zwar die Blutungsneigung postreperfusionell erhöhen; sie kann aber auch für das geringere postoperative Auftreten thromboembolischer Verschlüsse der A.hepatica mitverantwortlich gemacht werden (328,329). Die vorliegenden Ergebnisse wurden durch neuere Untersuchungen bestätigt (290). Weitere in-vivo Untersuchungen müssen klären, ob sich das völlige Weglassen des Adenosins oder die Verminderung seiner Konzentration in der UW-Lösung - z.B. durch ausgedehnteres Flushing - günstig auf die Hämostase und den postoperativen Verlauf der OLTs auswirken.



## 5.6. Einfluß der Spenderleber auf die Hämostase und Thrombozytenfunktion des Empfängers

Zur Evaluierung der pathophysiologischen Bedeutung der Spenderleber verglichen wir bei 10 konsekutiven OLTs (Patientenkollektiv s.Tab.1, Kapitel 4) die Hämostaseparameter und die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten (Patientenkollektiv s.Tab.10, Kapitel 5.3.) im Perfusat (P) mit Werten in der korrespondierenden systemischen Zirkulation der Patienten (5 Minuten vor Reperfusion (Abnahmezeitpunkt 4; vgl.3.2.).

### 5.6.1. Ergebnisse

#### 5.6.1.1. Fibrinolyseparameter

Die u-PA Aktivität (gemessen mit der Methode von Biopool, vgl. 3.3.1.) war im Perfusat erhöht. T-PA und PAI Aktivitäten, u-PA Ag (Biopool), Plasminogen und D-Dimere zeigten vergleichbare Werte und die Konzentrationen von t-PA Ag und PAP Komplexen und die Aktivität des C<sub>1</sub>-Inhibitors waren erniedrigt im Vergleich zur systemischen Konzentration kurz vor Reperfusion (Tab.17).

**Tabelle 17:** Vergleich der Hämostaseparameter im Perfusat (P) der Spenderleber mit der systemischen Zirkulation 5 Minuten vor Reperfusion (Abnahmezeitpunkt 4)

Parameter (Einheit)	Zeitpunkt	Median	(Spannbreite)	p (4/P)
Plasminogen (%)	systemisch	49	(22-74)	n.s.
	Perfusat	43	(10-77)	
t-PA Aktivität (IU/ml)	systemisch	14,7	(0-30,4)	0.070
	Perfusat	10,9	(0-15,6)	
t-PA Antigen (ng/ml)	systemisch	21,4	(14,3-44,9)	0.014
	Perfusat	17,9	(7,2-28,8)	
u-PA Aktivität (ng/ml)	systemisch	0,1	(0-0,52)	0.050
	Perfusat	0,16	(0-0,31)	
u-PA Antigen (ng/ml)	systemisch	0,3	(0-3,95)	0.200
	Perfusat	0,32	(0-6,0)	
C <sub>1</sub> -Inhibitor (%)	systemisch	77	(55-107)	0.006
	Perfusat	66	(27-92)	
PAI Aktivität (AU/ml)	systemisch	84	(0-34,8)	n.s.
	Perfusat	68	(0-27,5)	
PAP Komplexe (ng/ml)	systemisch	34	(6-275)	0.006
	Perfusat	16,5	(0,81-71)	
Fibrinogen (g/l)	systemisch	1,92	(1,1-2,7)	0.018
	Perfusat	1,54	(0,5-2,2)	
AT III Aktivität (%)	systemisch	70	(35-89)	0.004
	Perfusat	38	(26-56)	
Protein C Aktivität (%)	systemisch	24	(8-54)	0.003
	Perfusat	12	(0-24)	
totales Protein S Antigen (%)	systemisch	82,5	(41-98)	0.069
	Perfusat	70	(11-106)	
Fibrinmonomer (0-+++)	systemisch	2	(0-3)	n.s.
	Perfusat	2	(0-3)	
D-Dimere (mg/l)	systemisch	1,5	(0-4)	n.s.
	Perfusat	2	(0-16)	

TAT Komplexe (mg/ml)	systemisch	30	(15-270)	0.005
	Perfusat	105	(10-324)	
vWF Antigen (%)	systemisch	307	(194-405)	n.s.
	Perfusat	292	(36-446)	

#### 5.6.1.2. Gerinnungsparameter

Die TAT Komplexe waren im Perfusat deutlich erhöht, während die Inhibitoren Protein C, totales Protein S Ag und AT III deutlich und Fibrinogen leicht erniedrigt waren. Die Konzentrationen des vWF Ag und der Fibrinmonomere unterschieden sich nicht in Perfusat und systemischer Zirkulation (Tab.17).

#### 5.6.1.3. Thrombozytenfunktionsparameter

Die Thrombozytenzahl unterschied sich nicht signifikant zwischen Perfusatproben und systemischer Zirkulation (Tab.18). In der Ristocetin- und in der Kollagen (1µg/ml) - induzierten Thrombozytenaggregation waren die maximalen Aggregationsantworten in den Perfusatproben geringer im Vergleich zur systemischen Zirkulation. In der ADP (2µmol/l) - getriggerten Aggregationsfähigkeit unterschieden sich die höheren Werte der MA in der systemischen Zirkulation nur tendentiell von den Werten der Perfusatproben (Tab.18).

**Tabelle 18:** Vergleich der Thrombozytenaggregabilität (gemessen als Maximalamplitude (%)) und der Thrombozytenzahl im Perfusat (P) und der korrespondierenden systemischen Zirkulation (Abnahmezeitpunkt 4)

Agonist	Zeitpunkt	Median	(Spannbreite)	p (4/P)
Kollagen (1µg/ml)	Systemisch	63	(0-89)	0.018
	Perfusat	30	(0-77)	
ADP (2µmol/l)	Systemisch	28	(0-74)	0.088
	Perfusat	11	(0-73)	
Ristocetin (1,2mg/ml)	Systemisch	42	(0-93)	0.013
	Perfusat	21,5	(0-82)	
S	Sytemisch	154000	(69 000-246 000)	n.s.
	Perfusat	179000	(58 000-255 000)	

#### 5.6.2. Diskussion

Zwischen Entnahme und Reperfusion wird die Spenderleber in einer kalten Konservierungslösung aufbewahrt, mit der sie auch unmittelbar nach Entnahme durchspült wird. Während dieser kalten Ischämiezeit kommt es durch reduzierten Zellstoffwechsel bei Endothelzellen, Hepatozyten und bei an der Gefäßwand verbleibenden Blutzellen zu Schädigungen mit Diffusionsstörungen und Zelluntergängen. Intravasal reichern sich auf diese Weise verschiedene primär intrazelluläre und aktiv sezernierte Substanzen an. In schlecht präservierten Transplantaten konnte eine Desquamation von Endothelzellen nachgewiesen werden (261). Durch Spülung der Spenderleber mit arteriellem Empfängerblut vor Öffnung der hepatocavalen Anastomose, dem sog. Flushing, wird erreicht, daß ein Großteil der Konservierungslösung und während der Lagerungszeit entstandener Freisetzungprodukte herausgespült werden. Der Restteil scheint jedoch an der Genese postreperfusioneller Hämostasestörungen mitbeteiligt zu sein. Dieses wird unterstützt durch die Beobachtung, daß in humanen und tierexperimentiellen OLTs die Schwere der Hämostasestörungen von der Qualität des Spenderorgans (27,108,170) und der Länge der kalten Ischämiezeit (171,265,348) abhängt.

Das Perfusat ist eine Mischung aus arteriellem Blut, das in die Spenderleber einströmt, und Resten der Konservierungsflüssigkeit. Daraus erklärt sich, daß bei einem Großteil der Hämostaseparameter im Perfusat, verglichen mit der systemischen Zirkulation, entsprechende bzw. erniedrigte Werte gemessen wurden. Dieses traf zu für t-PA und PAI Aktivitäten, t-PA Ag, Fibrinogen, vWF Ag und Fibrinmonomere.

Im Gegensatz dazu fielen deutlich erhöhte Spiegel der TAT Komplexe und überproportional erniedrigte Spiegel der Proteaseinhibitoren Protein C, Protein S, AT III und des C<sub>1</sub>-Inhibitors auf. Diese Parameterkonstellation deutet auf eine ausgeprägte Prothrombinaktivierung im Transplantat mit Verbrauch der Inhibitoren hin. Die systemisch postreperfusionell beobachteten DIC-artigen Veränderungen können hierdurch ausgelöst sein (vgl. Kapitel 4). Die gleichzeitige Erhöhung leukozyitärer Mediatoren (vgl. Kapitel 5.4.1., 141), der Zytokine IL-6 und IL-8 (vgl. 5.4.2., 142) und des endothelialen Markers sThrombomodulin (vgl. Kapitel 5.4.3., 136) im Perfusat sprechen für deren pathophysiologische Mitbeteiligung.

Porte et al. berichteten 1989 (273,275) erstmalig, daß tierexperimentell die fibrinolytische Aktivität im Perfusat signifikant höher sei als die fibrinolytische Aktivität in der systemischen Zirkulation. Sie (273) führten die von ihnen mit Hilfe der Euglobulinlysezeit gemessene Steigerung des fibrinolytischen Potentials im Perfusat auf eine Aktivitätserhöhung des extrinsischen fibrinolytischen Systems zurück. Es wurde jedoch im Rahmen dieser Untersuchung kein t-PA bestimmt. Die vorliegenden Ergebnisse können diese Vermutung nicht bestätigen, da t-PA Ag und t-PA Aktivität deutlich erniedrigt im Perfusat zu messen waren.

Bei den vorliegenden Ergebnissen fiel eine erhöhte u-PA Aktivität im Perfusat auf. Sie macht eine Aktivierung des intrinsischen fibrinolytischen Systems - vorstellbar am ischämisch alterierten Endothel des Gefäßbettes der Spenderleber als Fremdoberfläche (Abb.48, vgl.5.2.2.3.) - wahrscheinlich. Die vorbeschriebene erniedrigte i-PA Aktivität (vgl.5.2.2.2.) und die hochsignifikant erniedrigten PAP Komplexe im Perfusat scheinen jedoch einer verstärkten Plasminfreisetzung durch u-PA zu widersprechen. Plausibler scheint eine hepatische Freisetzung von u-PA die erhöhte u-PA Aktivität im Perfusat zu erklären (vgl.5.2.2.1.).

Beim Vergleich der ex vivo induzierten Thrombozytenaggregation in Proben aus Perfusat und systemischer Zirkulation zeigte sich eine verminderte Aggregationsantwort im Perfusat. Dieser Unterschied ließ sich nur für die Kollagen-induzierte und die Ristocetin-getriggerte Aggregation statistisch sichern. Die vorhergehenden Untersuchungen hatten gezeigt, daß die UW-Konservierungslösung in vitro zu einer Reduktion der Thrombozytenaggregation führt. Es ist zu diskutieren, ob die ex vivo gemessene Verminderung der Thrombozytenaggregation durch Einfluß der Konservierungsflüssigkeit bedingt ist und/oder auf die Wirkung endothelial sezernierter bzw. während der kalten Ischämiezeit durch Zellabbau freigesetzter Mediatoren zurückzuführen ist. Auch ist es möglich, daß eine submaximale Thrombozytenstimulation durch in der Transplantatleber gebildetes Thrombin (s.o.) mit konsekutiv verminderter Stimulierbarkeit der Thrombozyten erfolgt.

## **6. KLINISCHE STUDIEN ZUR THERAPEUTISCHEN BEEINFLUSSUNG DER HÄMOSTASE- UND THROMBOZYTENFUNKTIONSTÖRUNGEN BEI ORTHOTOPER LEBERTRANSPLANTATION**

### **6.1. Einleitung**

Die bisherigen Ergebnisse zeigten die Bedeutung des fibrinolytischen Systems vor allem in der anhepatischen Phase. In der Reperusionsphase konnte eine Aktivierung des Gerinnungssystems gemessen werden bei gleichzeitigem Anstieg leukozytärer Aktivierungsmarker und Parameter einer Endothelzellschädigung (sThrombomodulin). Ein entscheidender Einfluß scheint dabei der während der kalten Ischämiezeit vor Implantation geschädigten Spenderleber zuzukommen. Ein alteriertes Endothel der Spenderleber führt zur gesteigerten Thrombozyten-, Leukozyten- und Gerinnungsaktivierung mit der Folge einer herabgesetzten postreperfusionellen thrombozytären Aggregabilität, einer gesteigerten Generierung leukozytärer Aktivierungsmarker und einem reduzierten Gerinnungspotential.

Intrahepatisch geschädigte RES-Zellen und Hepatozyten setzen intrazelluläre leukozytäre Enzyme, vor allem Kathepsin B, frei, die ebenfalls die plasmatische Gerinnung aktivieren.

Für eine therapeutische Beeinflussung ergeben sich dadurch mehrere Angriffspunkte, von denen wir zwei untersuchten:

1. die Beeinflussung der gesteigerten Fibrinolyse durch Aprotiningabe und
2. der Versuch durch Gabe von Prostaglandin E<sub>1</sub> die ischämische Leberschädigung mit ihren Auswirkungen auf Hämostase und Thrombozytenaggregabilität zu reduzieren.

### **6.2. Aprotininbolusgabe versus Infusionsgabe bei der Beeinflussung hyperfibrinolytischer Hämostasestörungen während orthotoper Lebertransplantation**

#### **6.2.1. Einleitung**

Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, daß eine dreimalige Aprotininbolusgabe bei OLT (3 x 0.5 Mill. KIU) klinisch zu einer verminderten Blutungsneigung mit deutlich niedrigerem Transfusionsbedarf führte (251). Der anhepatische t-PA Anstieg und die erreichten Maxima am Ende der anhepatischen Phase waren geringer (119,120, vgl.Kapitel 4) als in anderen Transplantationszentren (29,78,275). Trotzalledem fanden sich bei den meisten OLTs unter dieser Aprotininmedikation Zeichen einer Hyperfibrinolyse im TEG. Die komplikationslose und erfolgreiche hochdosierte Aprotiningabe bei Herzoperationen mit kardiopulmonalem Bypass (5 Mill.KIU/2h) (72,89,289) und bei Polytraumapatienten (17.5 Mill. KIU/24h) (48) veranlaßte uns zwischen 9/89 und 5/90 eine randomisierte, offene und prospektive Studie bei 23 konsekutiven OLTs (Tab.19) durchzuführen (126,127,137). 13 Patienten erhielten Aprotinin als Bolusgabe (Bolusgruppe) und 10 als kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) (Tab.20). Die Zuteilung erfolgte über fortlaufend nummerierte Briefumschläge, die nach Zufallsverteilung die Art der Aprotiningabe enthielten. Die Patienten waren über die Durchführung der prospektiven Studie informiert und hatten präoperativ ihr Einverständnis gegeben.

**Tabelle 19:** Diagnose und Charakteristika von 23 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

Diagnose	Bolusgruppe			Infusionsgruppe		
	weibl.	männl.	Alter*	weibl.	männl.	Alter*
Postnekrotische Zirrhose	1	4	50(43-65)	4	4	49(24-65)
Alkoholtoxische Zirrhose	3	1	49(40-56)	0	0	
Primäre biliäre Zirrhose	1	0	24	1	0	55
Sekundäre biliäre Zirrhose	1	0	52	0	0	
Leberzellcarcinom	1	0	60	0	0	
Metastasenleber	0	0		1	0	55
Budd-Chiari Syndrom	1	0	46	0	0	
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>47(40-65)</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>53(24-65)</b>

\*Median (Spannbreite) in Jahren

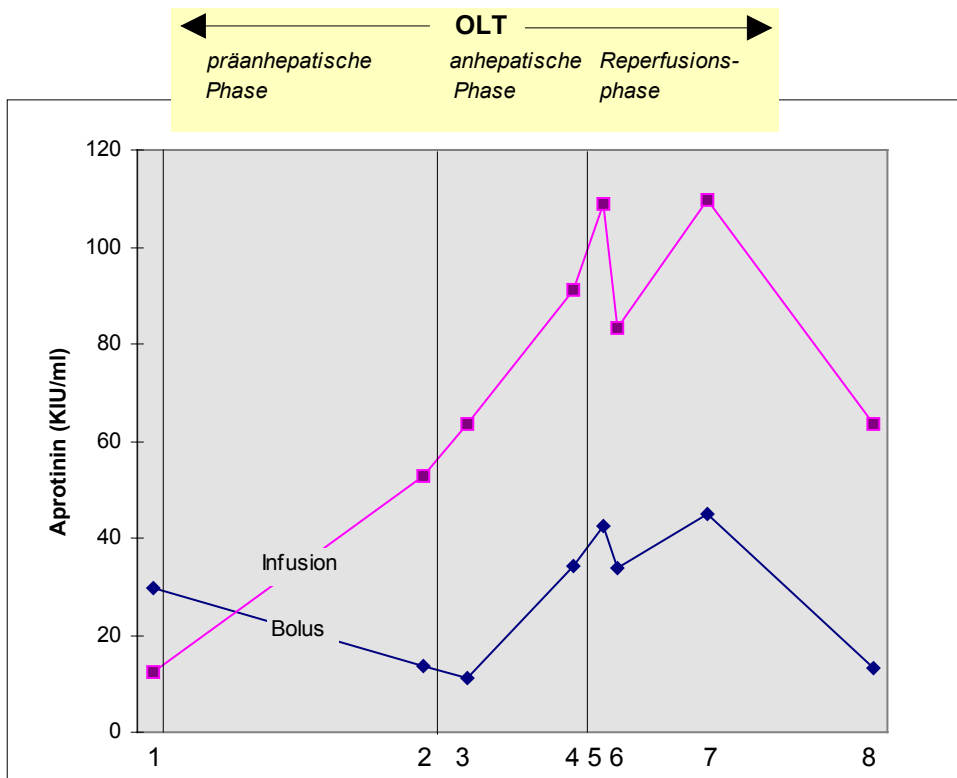
**Tabelle 20:** Dosierschemata der Aprotiningabe

Bolusgruppe		Infusionsgruppe
0,5 Mill. KIU als Bolus	mit Anästhesiebeginn	0,2 Mill. KIU/Std.
0,5 Mill. KIU als Bolus	mit Beginn der anhepatischen Phase	0,4 Mill. KIU/Std.
0,5 Mill. KIU als Bolus	mit Beginn der Reperfusionsphase	0,4 Mill. KIU/Std.
Heparin 250 IE/Std.	mit Operationsende	0,1 Mill. KIU/Std.+Heparin 250 IE/Std.

### 6.2.2. Ergebnisse

Bei beiden Gruppen wurden keine Hinweise auf intra- oder postoperative Thromboembolien gesehen. Zwei Patienten der Infusionsgruppe entwickelten im Verlauf der ersten postoperativen Woche eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. Der Transfusionsbedarf lag bei der Bolusgruppe (Median (Spannweite)) bei 8 (4-26) EK und 10.5 (7-35) FFP Einheiten und bei der Infusionsgruppe bei 7 (2-20) EK und 8 (2-28) FFP Einheiten (n.s.). Während der ersten drei postoperativen Tage war der EK-Bedarf mit 1.5 (0-6) Einheiten bei der Infusionsgruppe signifikant ( $p=0.045$ ) geringer als bei der Bolusgruppe mit 3.5 (0-9) Einheiten. Der Transfusionsbedarf von FFP unterschied sich nicht (Infusionsgruppe: 6.5 (0-17), Bolusgruppe: 9.5 (4-22)). Die Intensivbehandlung betrug 25 (14-58) Tage bei der Bolusgruppe und 23 (11-36) Tage bei der Infusionsgruppe (n.s.).

Die Aprotininspiegel lagen zu allen Abnahmezeitpunkten signifikant höher bei der Infusionsgruppe (Abb.71). Das TEG zeigte hyperfibrinolytische Veränderungen bei 7 der 13 OLTs in der Bolusgruppe und nur bei einer der 10 OLTs in der Infusionsgruppe (Abb.72). Die t-PA Aktivitäten (Abb.73) stiegen bei allen 23 OLTs während der anhepatischen Phase an und erreichten kurz vor Reperfusionsbeginn ihre Maxima, die bei der Bolusgruppe signifikant höher lagen als bei der Infusionsgruppe. Der Verlauf der t-PA Ag Werte im Plasma (Abb.74) unterschied sich nicht. Ein vergleichbarer PAI Anstieg konnte bei beiden Gruppen beobachtet

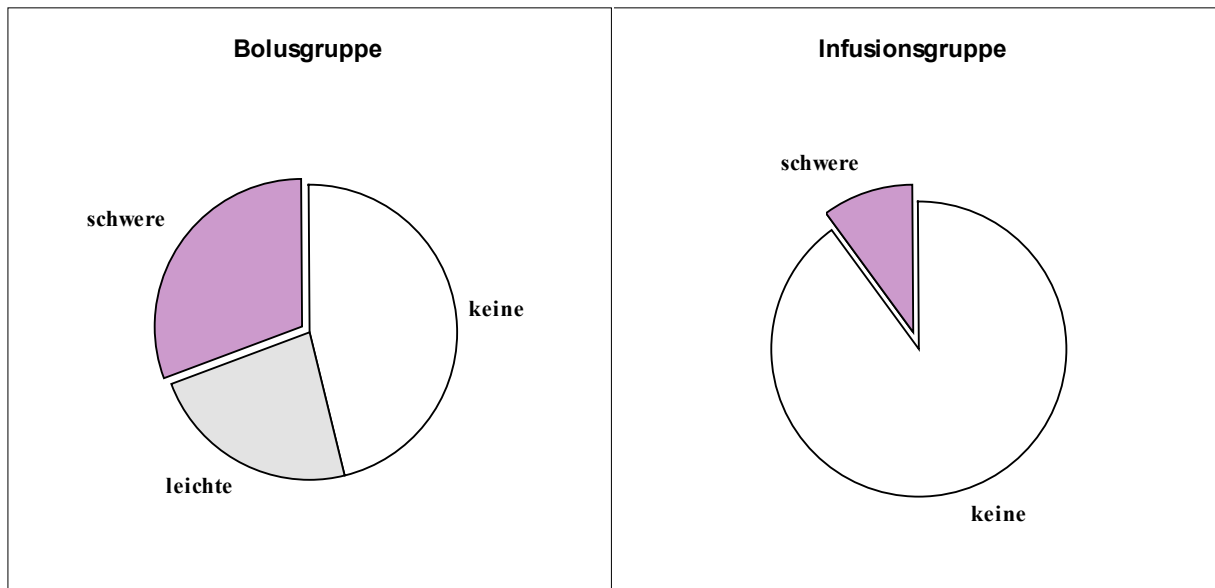


**Abbildung 71:** Aprotininspiegel während orthotoper Lebertransplantationen bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedrig dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolus) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusion) erhielten.

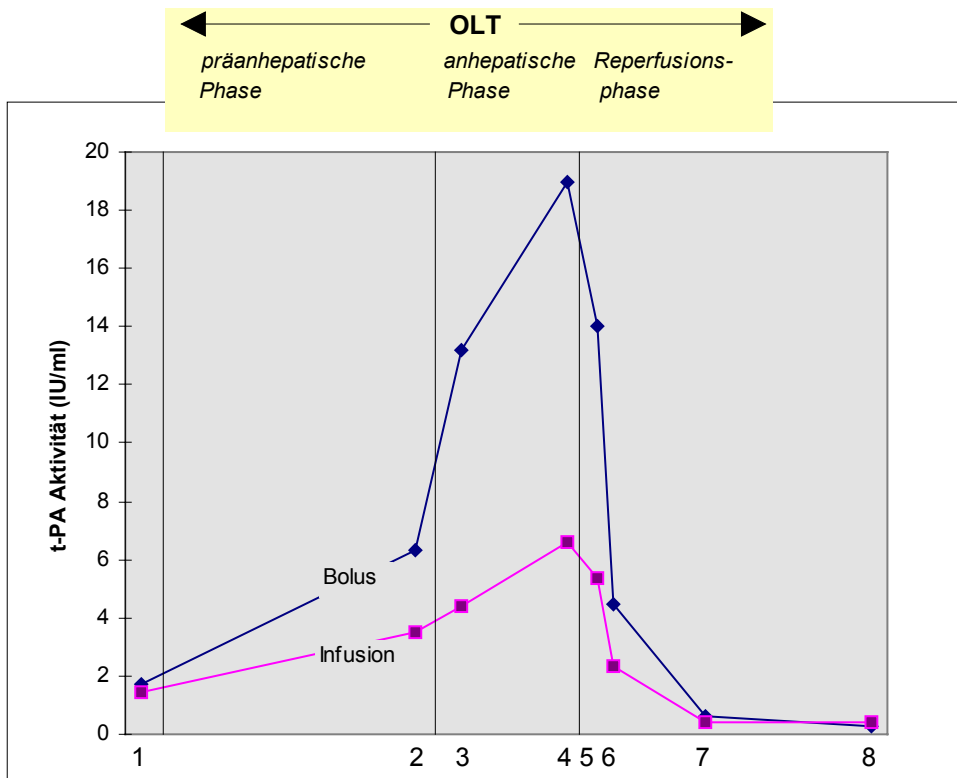
Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
Aprotinin (KIU/ml) <b>Bolus</b>	1-115,5	1,1-65,3	0-59,4	5,9-152,5	2-119,5	2-190,7	3,3-282,5	2-97,7
Aprotinin (KIU/ml) <b>Infusion</b>	0,1-29,1	27,1-87,8	25,7-151,7	37,6-178,9	41,6-198	0-219,1	46,8-198,7	42,9-142,6

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf					
<b>Bolusgruppe</b>				p(1/5) =0.037	p(1/7) =0.008
<b>Infusionsgruppe</b>			p(1/3) =0.012	p(1/4) =0.002	p(7/8) =0.006
				p(1/5) =0.001	p(7/8) =0.003

Statistische Unterschiede zwischen Bolus- und Infusionsgruppe							
p(Zeitpunkt)	p(2) =0.003	p(3) =0.003	p(4) =0.046	p(5) =0.003	p(6) =0.003	p(7) =0.006	p(8) =0.004



**Abbildung 72:** Zeichen einer Hyperfibrinolyse gemessen mit der Vollblutgerinnungszeit (whole blood lysis time, WBLT) im TEG (WBLT > 120 Minuten: keine Hyperfibrinolyse, WBLT < 120 und > 90 Minuten: leichte Hyperfibrinolyse und WBLT < 90 Minuten: schwere Hyperfibrinolyse) bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten.



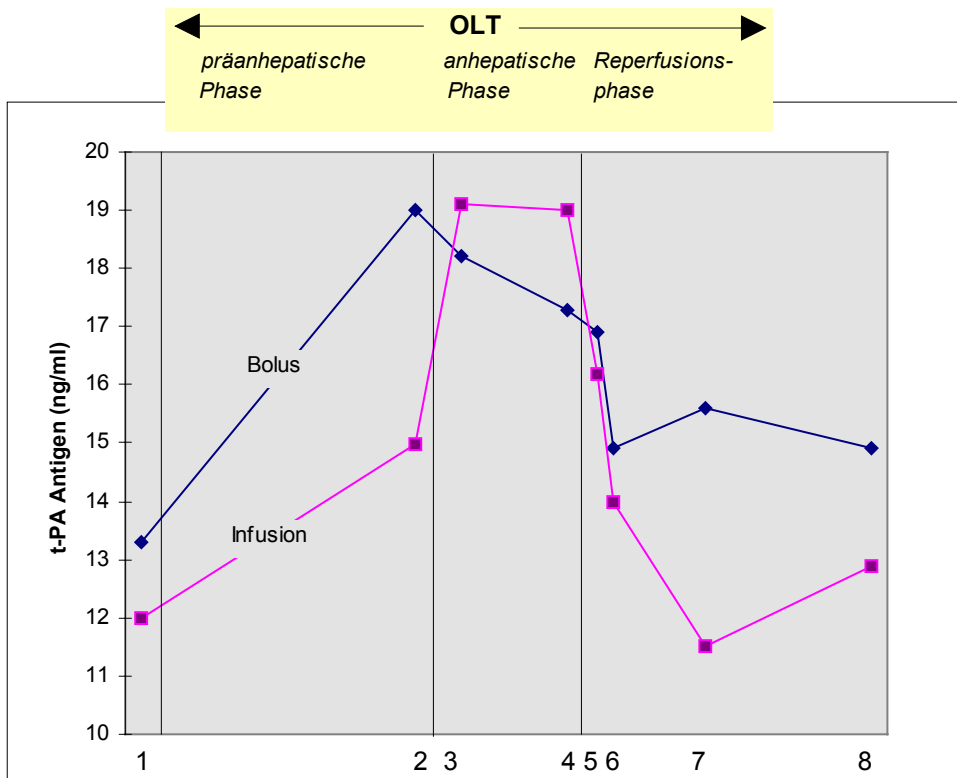
**Abbildung 73:** t-PA (tissue-type Plasminogenaktivator) Aktivität während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
t-PA Akt (IU/ml)	0-7,8	0-23,3	0,8-34,5	0-180	0,8-142	0,7-32,6	0-5,1	0-1
<b>Bolus</b>								
t-PA Akt (IU/ml)	0,3-10,7	0-22,7	0-23,9	1,6-34,4	1-227	0,3-41	0,6-2,7	0-0,7
<b>Infusion</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
<b>Bolusgruppe</b>	p(1/4) =0.008		p(4/7) =0.005	p(4/8) =0.006
<b>Infusionsgruppe</b>	p(1/4) =0.007	p(4/6) =0.012	p(4/7) =0.009	p(4/8) =0.009

Statistische Unterschiede zwischen Bolus- und Infusionsgruppe		
p(Zeitpunkt)	p(3) =0.05	p(4) =0.046

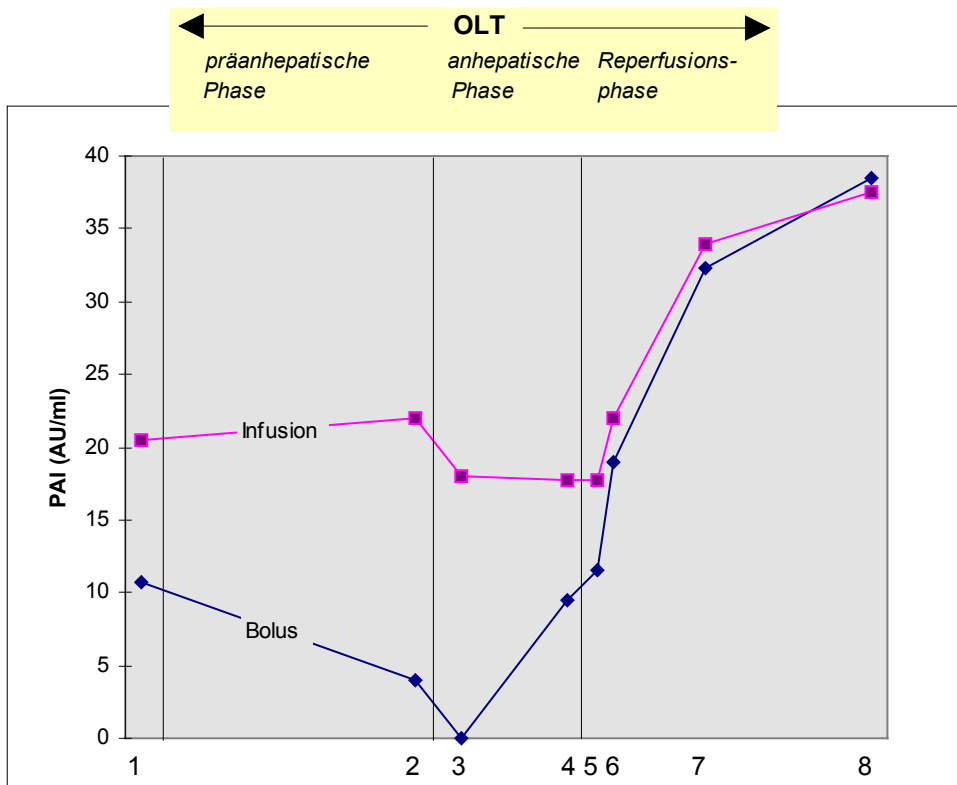




**Abbildung 74:** t-PA Ag (tissue-type Plasminogenaktivator Antigen) während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten. Es bestanden keine signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
t-PA Ag (ng/ml)	6,2-22	10,4-24,6	11,9-25	12-25	12,9-28,8	9,3-24,5	6,6-20,8	3-24,4
<b>Bolus</b>								
t-PA Ag (ng/ml)	1,7-20,5	7-30,2	10,3-30	13-33	11,5-32,4	10,6-24	8,1-19,3	4,9-21
<b>Infusion</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf					
<b>Bolusgruppe</b>	p(1/2)=0.002	p(4/6)=0.036	p(4/7)=0.011	p(4/8)=0.006	
<b>Infusionsgruppe</b>	p(1/3)=0.008	p(1/4)=0.008	p(4/5)=0.018	p(4/6)=0.007	p(4/7)=0.003



**Abbildung 75:** PAI (Plasminogenaktivatorinhibitor) Aktivität während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten.

#### Spannweiten

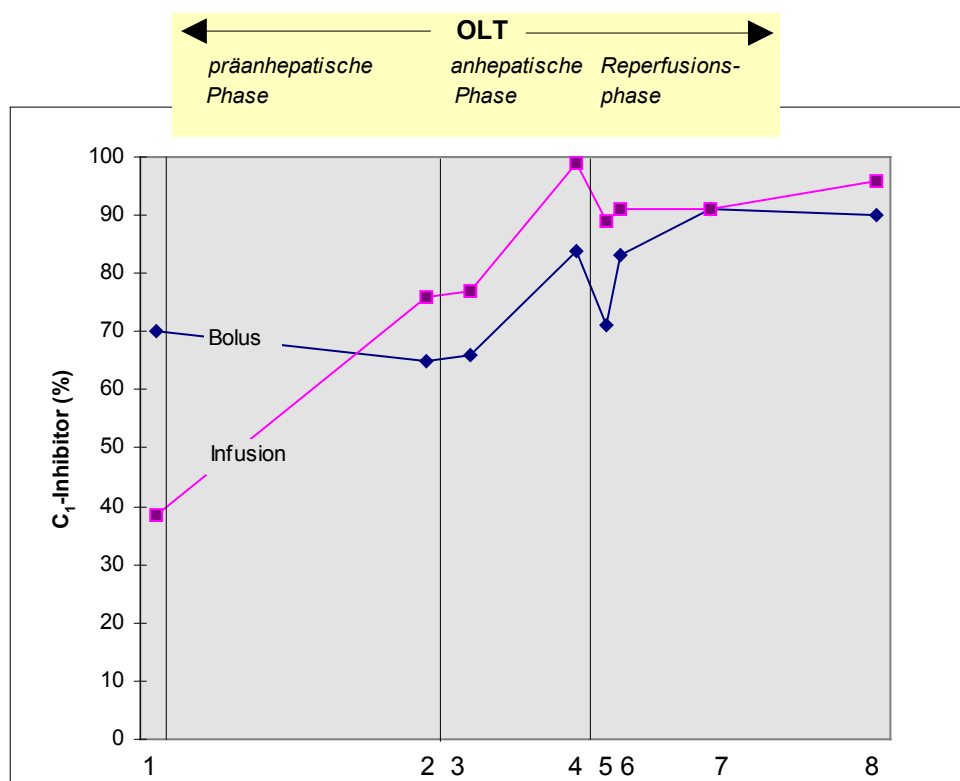
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
PAI (AU/ml) <b>Bolus</b>	0,3-35,8	0-34,5	0-32,2	0-34,8	0-26,2	0-37,8	0-40	21-40
PAI (AU/ml) <b>Infusion</b>	0-38,8	0-34,5	0-33,8	7,4-29,8	11,4-30,4	13,2-33,8	16-39,6	12-40,2

#### Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf

Bolusgruppe	p(5/6)=0.003	p(6/7)=0.001
Infusionsgruppe	p(5/6)=0.001	p(6/7)=0.004

#### Statistische Unterschiede zwischen Bolus- und Infusionsgruppe

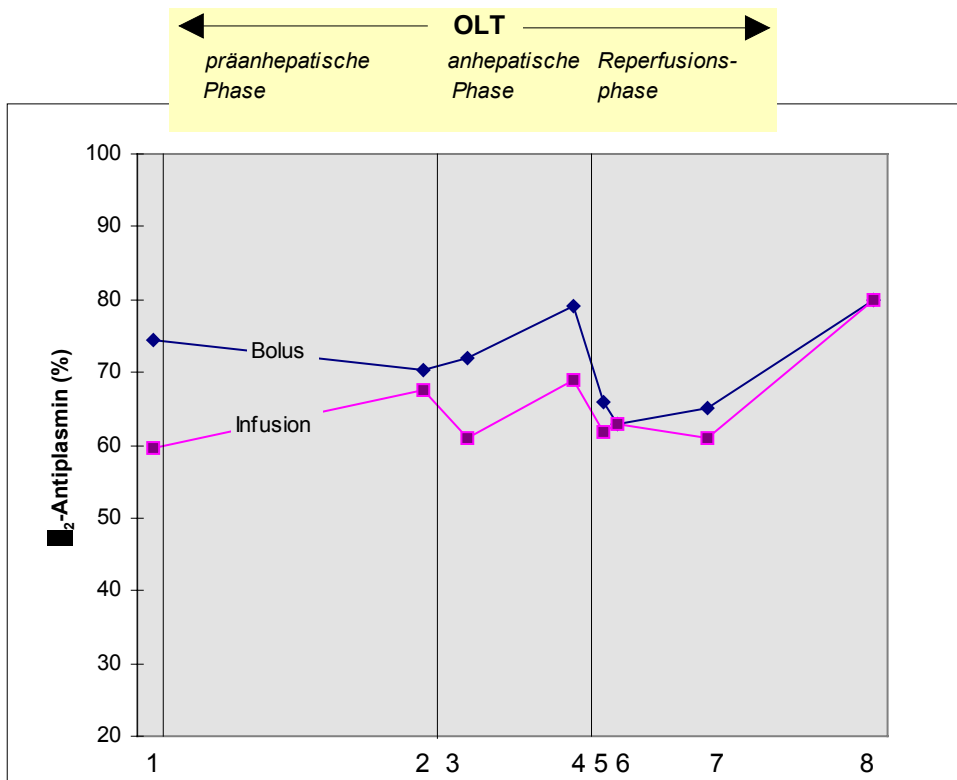
p(Zeitpunkt)	p(3)=0.08
--------------	-----------



**Abbildung 76:** C<sub>1</sub>-Inhibitor Aktivität während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
C <sub>1</sub> - Inhibitor (%) <b>Bolusgruppe</b>	15-135	58-117	48-110	55-107	45-99	48-96	54-114	64-92
C <sub>1</sub> - Inhibitor (%) <b>Infusionsgruppe</b>	54-114	51-114	37-112	47-117	44-99	44-94	49-94	69-114

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
Bolusgruppe	p(2/3)=0.004	p(4/5)=0.002	p(5/6)=0.009	p(7/8)=0.025
Infusionsgruppe	p(2/3)=0.003	p(3/4)=0.004	p(4/5)=0.005	p(7/8)=0.003

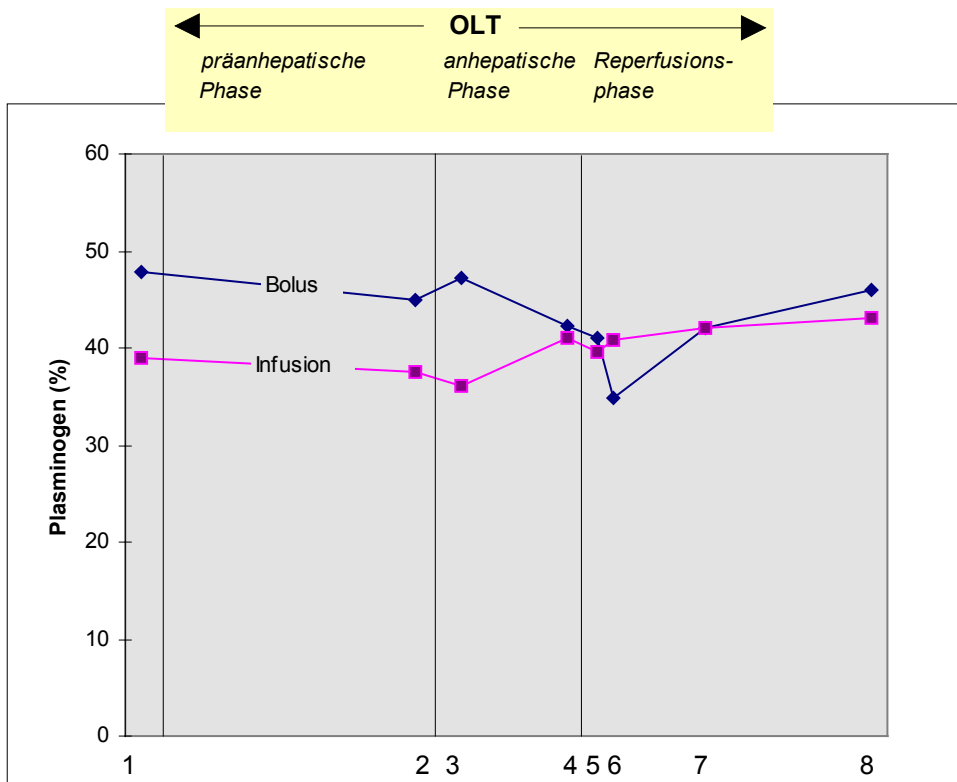


**Abbildung 77:**  $\alpha_2$ -Antiplasminaktivität während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
$\alpha_2$ -Antiplasmin (%) Bolusgruppe	33-118	42-122	36-87	72-126	55-118	56-121	66-130	48-117
$\alpha_2$ -Antiplasmin (%) Infusionsgruppe	18-73	53-97	55-102	82-116	71-104	74-101	76-114	71-111

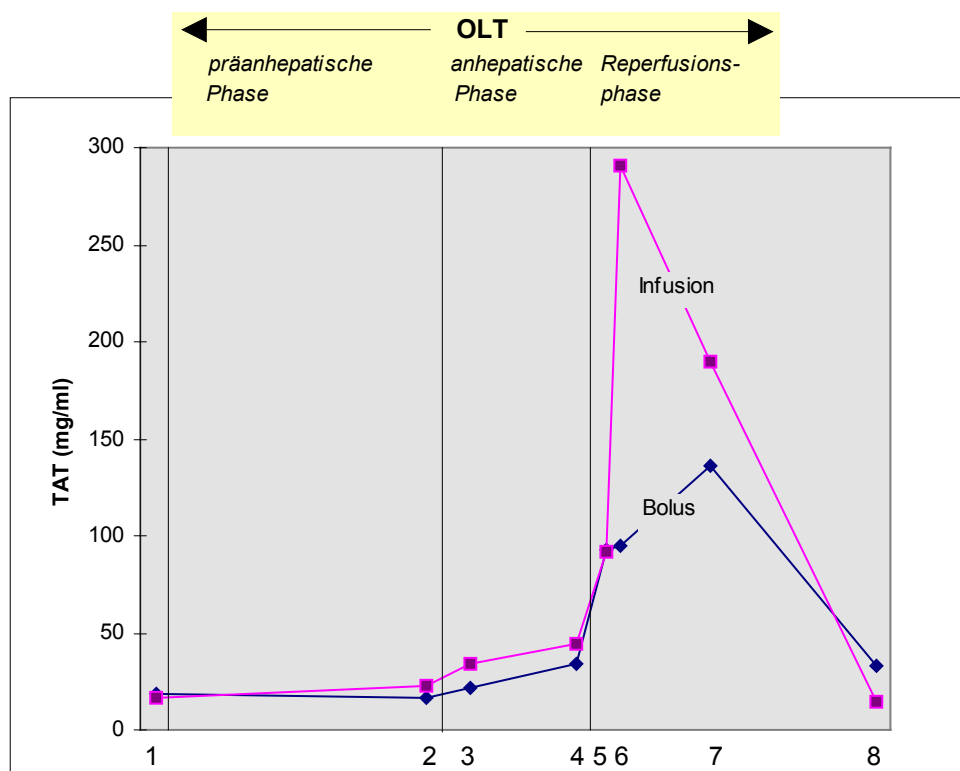
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
Bolusgruppe	p(3/4)=0.002	p(4/5)=0.006	p(1/8)=0.033
Infusionsgruppe	p(3/4)=0.003	p(4/5)=0.003	p(1/8)=0.003

Statistische Unterschiede zwischen Bolus- und Infusionsgruppe		
p(Zeitpunkt)	p(3)=0.046	p(8)=0.03



**Abbildung 78:** Plasminogenspiegel während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen und im Verlauf der einzelnen Kurven bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
Plasminogen (%) Bolusgruppe	12-71	24-79	22-68	22-74	27-64	27-66	26-67	28-77
Plasminogen (%) Infusionsgruppe	22-71	31-75	27-72	23-64	28-62	27-60	28-63	37-51

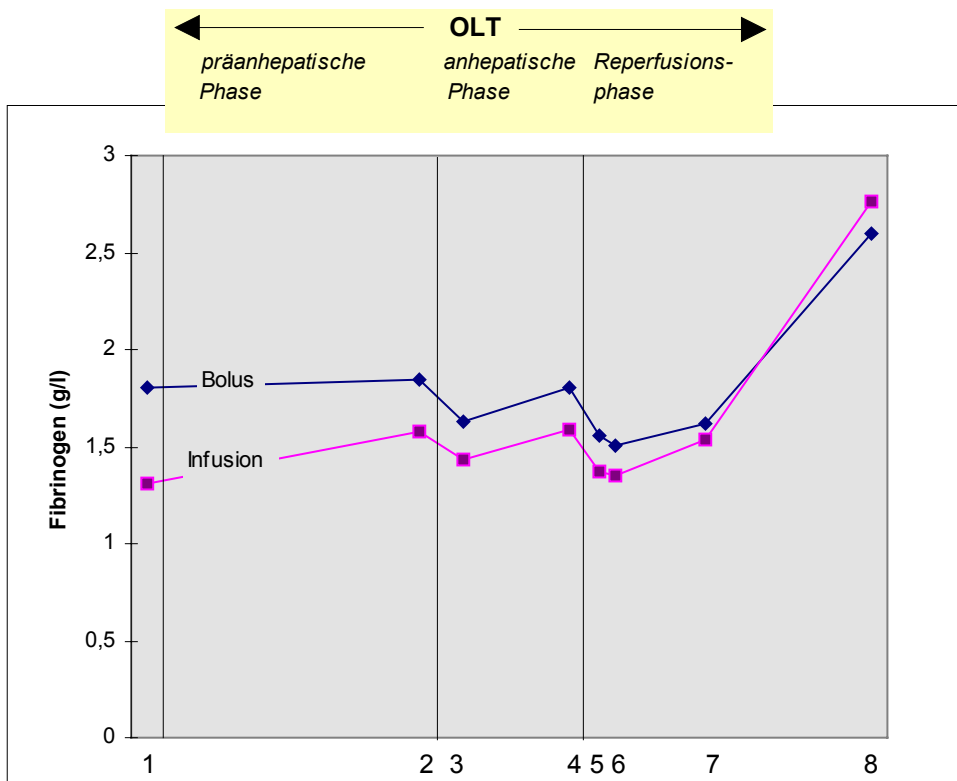


**Abbildung 79:** Konzentration der Thrombin-Antithrombin III Komplexe (TAT) während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
TAT (mg/ml) <b>Bolusgruppe</b>	5,1-50	2,8-57	11,2-93	15,7-341	26-272	12-330	35,8-260	7,8-255
TAT (mg/ml) <b>Infusionsgruppe</b>	7,3-48	8,7-66	14,5-74	17-381	46-555	55-925	44-710	6,7-110

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf								
<b>Bolusgruppe</b>	p(2/3) =0.005		p(3/4) =0.004	p(4/5) =0.037	p(5/6) =0.037		p(7/8) =0.001	
<b>Infusionsgruppe</b>	p(1/2) =0.003	p(2/3) =0.026	p(3/4) =0.026	p(4/5) =0.014	p(5/6) =0.023	p(6/7) =0.018	p(7/8) =0.003	

Statistische Unterschiede zwischen Bolus- und Infusionsgruppe					
p(Zeitpunkt)	p(2)=0.03	p(3)=0.02	p(6)=0.04	p(7)=0.08	

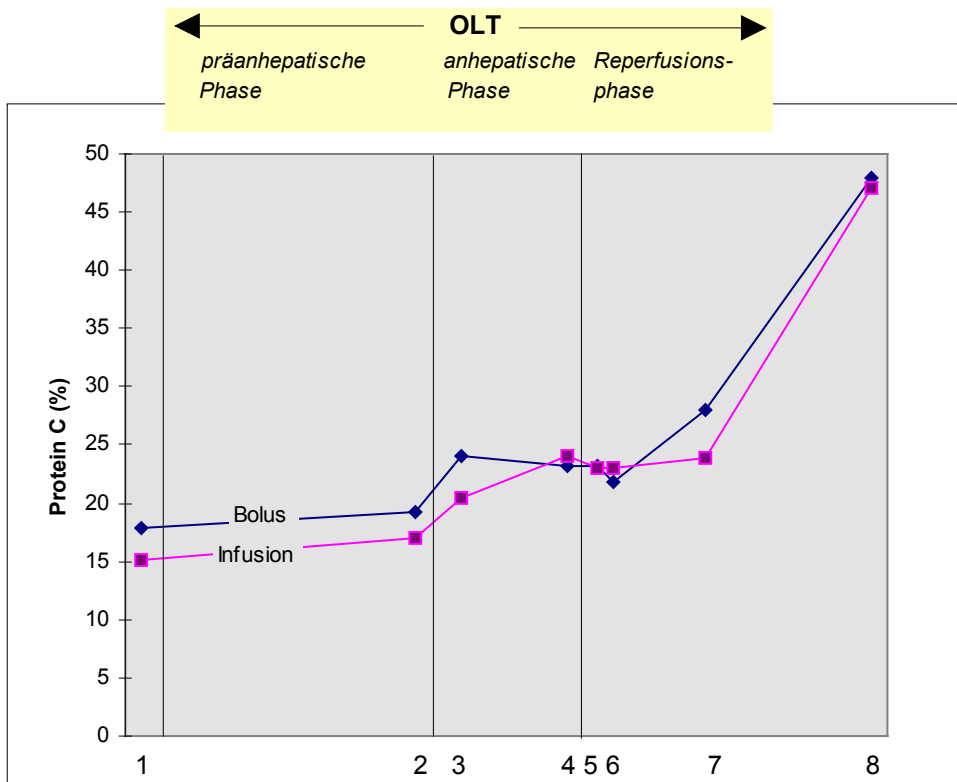


**Abbildung 80:** Fibrinogenkonzentration während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Bolusgruppe</b>								
Fibrinogen (g/l)	0,3-4,2	0,7-3	0,7-2,7	1,1-3,0	0,6-2,3	1,1-2,1	1,1-2,5	1,6-3,1
<b>Infusionsgruppe</b>								
Fibrinogen (g/l)	0,7-3,5	1,2-3,2	1,1-2,9	1,3-2,6	1,2-2,5	1,2-2,2	1,2-2,9	2,1-3,9

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf					
<b>Bolusgruppe</b>	p(2/3)=0.001	p(3/4)=0.017	p(4/5)=0.002	p(6/7)=0.042	p(7/8)=0.002
<b>Infusionsgruppe</b>	p(2/3)=0.01	p(3/4)=0.049	p(4/5)=0.003	p(6/7)=0.008	p(7/8)=0.003

Statistische Unterschiede zwischen Bolus- und Infusionsgruppe		
p(Zeitpunkt)	p(2)=0.03	p(6)=0.03

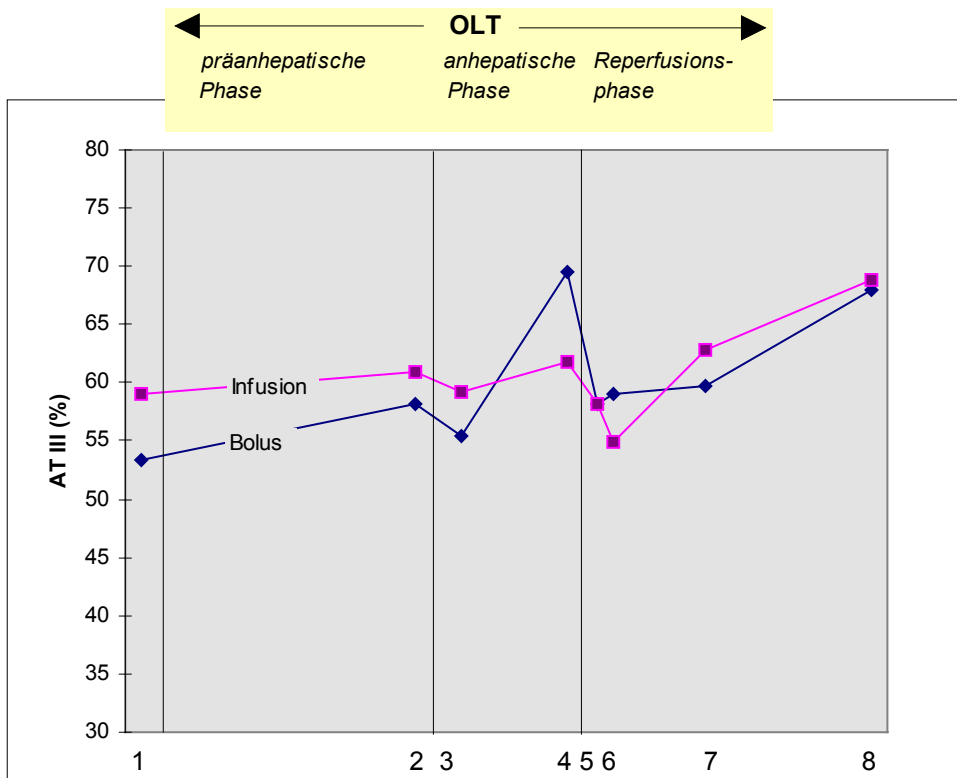


**Abbildung 81:** Protein C Aktivität während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
Protein C (%)	6-69	5-60	3-50	9-54	12-39	13-42	15-38	27-83
<b>Bolusgruppe</b>								
Protein C (%)	3-48	3-47	3-50	11-61	14-47	14-52	14-40	36-88
<b>Infusionsgruppe</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
<b>Bolusgruppe</b>	p(2/3)=0.046	p(5/6)=0.001	p(7/8)=0.001
<b>Infusionsgruppe</b>	p(3/4)=0.011	p(4/5)=0.034	p(7/8)=0.003





**Abbildung 82:** Antithrombin III Aktivität (AT III) während orthotoper Lebertransplantation bei 13 Patienten, die Aprotinin intraoperativ als niedriger dosierte, dreimalige Bolusgabe (Bolusgruppe) und bei 10 Patienten, die Aprotinin als höher dosierte, kontinuierliche Infusion (Infusionsgruppe) erhielten. Es bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Bolusgruppe</b> AT III (%)	23-80	24-87	20-72	33-89	31-79	29-76	28-75	39-82
<b>Infusionsgruppe</b> AT III (%)	19-78	28-114	26-118	41-104	39-78	39-95	41-96	44-80

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
Bolusgruppe	p(3/4)=0.005	p(4/5)=0.002	p(1/8)=0.01
Infusionsgruppe		p(4/5)=0.014	p(1/8)=0.039

werden (Abb.75). Der Verlauf des C<sub>1</sub>-Inhibitors unterschied sich nicht (Abb.76). Die Spiegel des  $\alpha_2$ -Antiplasmins (Abb.77) waren bei der Infusionsgruppe höher, ein Unterschied, der ein Signifikanzniveau 10 Minuten nach Beginn der anhepatischen Phase und 12 Stunden nach Reperfusion erreichte. Da beim  $\alpha_2$ -Antiplasminassay (3.3.1.) die  $\alpha_2$ -Antiplasminaktivität über Plasminentstehung gemessen wird, ist eine Störung durch die gleichzeitig bestehende und signifikant unterschiedliche Aprotininkonzentration in den Plasmaproben beider Gruppen (Abb.71) denkbar. Die höheren  $\alpha_2$ -Antiplasminwerte der Infusionsgruppe bei höheren Aprotininspiegeln können dadurch erklärt werden. Die Plasminogenkonzentrationen (Abb.78) waren vergleichbar bei beiden Gruppen. Die TAT-Komplexe (Abb.79) lagen bei der Infusionsgruppe vor der anhepatischen Phase und mit bzw. nach Beginn der Reperfusion höher als bei der Bolusgruppe. Die Fibrinogenwerte (Abb.780) lagen bei der Bolusgruppe kurz vor der anhepatischen Phase und nach Reperfusion höher als bei der Infusionsgruppe. Die Verläufe der Inhibitoren Protein C (Abb.81) und AT III (Abb.82) unterschieden sich nicht zwischen beiden Gruppen.

Ein Vergleich der Perfusatproben (Tab.21) beider Gruppen zeigte signifikant tiefere t-PA Ag Spiegel und tendentiell niedrigere t-PA Aktivitäten in der Infusionsgruppe, während in dieser Gruppe die Aktivitäten der Inhibitoren PAI und  $\alpha_2$ -Antiplasmin signifikant erhöht waren. Für alle anderen Parameter konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen gemessen werden.

**Tabelle 21:** Vergleich der Hämostaseparameter im Perfusat in Bolus- (B) und Infusionsgruppe(I) der Aprotiningabe

Parameter (Einheit)	Gruppe	Median	(Spannbreite)	p (B/I)
Plasminogen (%)	Bolusgruppe	43	(3-77)	n.s.
	Infusionsgruppe	50	(35-87)	
t-PA Aktivität (IU/ml)	Bolusgruppe	12	(0,7-23,6)	n.s.
	Infusionsgruppe	5	(0,7-17,4)	
t-PA Antigen (ng/ml)	Bolusgruppe	12,3	(7,2-26,6)	0.050
	Infusionsgruppe	10,1	(1,2-19,3)	
C <sub>1</sub> -Inhibitor (%)	Bolusgruppe	65	(6-92)	n.s.
	Infusionsgruppe	73	(34-109)	
PAI Aktivität (AU/ml)	Bolusgruppe	6,4	(0-22)	0.043
	Infusionsgruppe	17,8	(8,8-30,4)	
$\alpha_2$ -Antiplasmin (%)	Bolusgruppe	63	(5-95)	0.010.
	Infusionsgruppe	93	(68-102)	
Fibrinogen (g/l)	Bolusgruppe	1,5	(0-2,2)	n.s.
	Infusionsgruppe	1,5	(0-2,6)	
AT III Aktivität (%)	Bolusgruppe	31	(3-56)	n.s.
	Infusionsgruppe	37	(9-55)	
Protein C Aktivität (%)	Bolusgruppe	9,5	(0-24)	0.063
	Infusionsgruppe	15	(3-50)	
TAT Komplexe (mg/ml)	Bolusgruppe	93,2	(40,5-324)	n.s.
	Infusionsgruppe	73,5	(32,5-1500)	

### 6.2.3. Diskussion

Alle 23 Patienten überlebten die OLT längerfristig (> 1 Jahr). Jeweils eine Frau der Bolus- und der Infusionsgruppe benötigten eine Retransplantation wegen schwerer Host-versus-graft Reaktion. Eine Leberarterienthrombose trat bei keiner der Patienten auf.

Vorhergehende Ergebnisse hatten einen günstigen Effekt einer dreimaligen Aprotininbolusgabe auf Fibrinolysezeichen und Transfusionsbedarf während OLT gezeigt (17,119,120,251). Die vorliegende Studie machte einen positiven Effekt auch bei der höher dosierten Aprotinin-Infusion deutlich. Bei hochsignifikant höheren Aprotininspiegeln in der Infusionsgruppe während der gesamten Operationsdauer kam es deutlich weniger zu Zeichen einer Hyperfibrinolyse (TEG). Es konnten signifikant niedrigere t-PA Aktivitäten besonders während der anhepatischen Phase gemessen werden. Parallel waren PAI (und  $\alpha_2$ -Antiplasmin)spiegel während der anhepatischen Phase bzw. nach Reperfusion in der Infusionsgruppe höher als in der Bolusgruppe. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß höhere Aprotininspiegel zu herabgesetzter t-PA Aktivität, verminderten Hyperfibrinolysezeichen mit konsekutiv reduzierterem Verbrauch an fibrinolytischen Inhibitoren führen. Nach Reperfusion waren bei der Infusionsgruppe ein steilerer Anstieg der TAT Komplexe bei gleichzeitig stärkerem Abfall der Fibrinogenwerte zu sehen, interpretierbar im Sinne einer verstärkten Prothrombinaktivierung. Höhere Aprotiningaben scheinen somit in der Reperfusionsphase das hämostatische Gleichgewicht in prokoagulatorische Richtung zu verschieben. Da sich jedoch die Spiegel der Gerinnungsinhibitoren - Protein C, AT III und C<sub>1</sub>-Inhibitor - nicht bei beiden Gruppen unterschieden, scheint es zu keinem höheren Inhibitorverbrauch im Sinne einer DIC bei der Infusionsgruppe gekommen zu sein.

Der Transfusionsbedarf war vergleichbar bei beiden Gruppen.

Bei den vorhergehenden Untersuchungen der Perfusatproben (119,120, Kapitel 5.6.) hatten signifikant erhöhte TAT Komplexe und signifikant erniedrigte Aktivitäten der Proteaseinhibitoren im Vergleich zur systemischen Zirkulation auf eine gesteigerte Prothrombinaktivierung und einen Verbrauch von Gerinnungsinhibitoren in der Spenderleber hingedeutet. Im Perfusat der Infusionsgruppe, d.h. in Gegenwart höherer Aprotininspiegel, lagen t-PA Ag und t-PA Aktivität niedriger und PAI (und  $\alpha_2$ -Antiplasmin) Aktivitäten höher als in der Bolusgruppe. Im Rattenlebertransplantationsmodell wurde von Lie et al. ein protektiver Effekt von Aprotinin auf die ischämische Schädigung der Transplantatleberendothelzellen beschrieben (210), die eine niedrigere t-PA Freisetzung erklären könnte. Eine entsprechende Protektion der endothelialen t-PA Freisetzung durch höhere Aprotininspiegel wäre auch bei humanen Transplantationen vorstellbar. Morgan et al. (232) konnten jedoch die Ergebnisse von Lie et al. nicht bestätigen. Parallel ist zu diskutieren, ob die Aprotinin-bedingte Hemmung des Kallikreins, einem via Bradykininbildung (vgl.Abb.2) potenten Stimulator der endothelialen t-PA Freisetzung, als Mechanismus Bedeutung zukommt (64).

Nicht offene und nicht randomisierte Studien konnten Vorteile einer intraoperativen Aprotinin-Infusion im Vergleich zu OLTs ohne Aprotiningabe zeigen (44,107,221). Mallett et al. (221) sahen eine Verminderung des Transfusionsbedarfs auf weniger als ein Drittel, signifikant weniger Hyperfibrinolysezeichen, verkürzte Dauer der Operation und der Intensivtherapie. Cauchie et al. (44) sahen einen deutlichen antifibrinolytischen Effekt mit

hochsignifikanter Verminderung des Transfusionsverbrauchs. Grosse et al. (107) berichteten bei Aprotinin-Infusion über einen hochsignifikant niedrigeren Transfusionsbedarf, niedrigere t-PA Aktivitätswerte, höhere Werte der fibrinolytischen Inhibitoren und fehlende Hyperfibrinolysezeichen. Prothrombinaktivierungsprodukte traten in beiden Patientengruppen in vergleichbarer Konzentration auf.

Spätere Studien (212,263,295,304) bestätigten die vorliegenden Ergebnisse, indem sie zeigten, daß die Aprotiningabe zur signifikanten Verminderung von Transfusionsbedarf und Fibrinolysepotential führt.

Eine erste prospektive, randomisierte und doppelblinde Studie (106), bei der gleichzeitig allen Patienten AT III zur Aufrechterhaltung eines AT III-Spiegels von über 70% verabreicht wurde, konnte die klinische Effektivität einer Aprotinin-Infusion während OLT nicht bestätigen. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich des Transfusionsbedarfs, der Operationsdauer und der Zeit der Intensivbehandlung zwischen beiden Gruppen. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß diese Studie an einem kleinen Patientenkollektiv durchgeführt wurde und daß der Transfusionsbedarf drei- bis viermal so hoch lag wie in anderen - die klinische Effektivität einer Aprotinintherapie bestätigenden - Studien (44,107,119,120,221). Eine spätere, große (n=80), prospektive, randomisierte und doppelblinde, spanische Studie (98) konnte ebenfalls keinen klinischen Vorteil bei Aprotiningabe zeigen. Die Vergleichbarkeit zu den vorliegenden Ergebnissen ist eingeschränkt, da die applizierte Aprotinindosis höher als in der vorliegenden Untersuchung war und in den meisten Fällen kein veno-venöser Bypass benutzt wurde.

Eine später veröffentlichte, amerikanische Untersuchung (224) verglich eine Kontrollgruppe ohne Aprotiningabe mit zwei Patientengruppen, die eine hohe und eine niedrig dosierte Aprotinin-Infusion erhielten. Es konnte gezeigt werden, daß bereits die niedrig dosierte Aprotinin-Infusion (200.000 KIU/Std.) ausreichend Fibrinolysetätigkeit und Transfusionsbedarf reduzierte.

Gefehlt hatte bisher die Bestätigung der klinischen Wirksamkeit von Aprotinin bei OLT in großen Multizenterstudien. Eine große, prospektive, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Multizenterstudie (EMSALT, european multicenter study on the use of aprotinin in liver transplantation) (276) konnte dies nun erstmalig zeigen. Sie wurde durchgeführt von 1994 bis 1998. Sechs europäische Transplantationszentren beteiligten sich daran, und es wurden insgesamt 137 Patienten eingeschlossen. Bei der Patientengruppe mit hochdosierter intraoperativer Aprotiningabe (Initialdosis von  $2 \times 10^6$  KIU gefolgt von  $1 \times 10^6$  KIU/Std. und zusätzlichem Bolus 20 Minuten vor Reperfusion von  $1 \times 10^6$  KIU) lagen Transfusionsbedarf hochsignifikant und Blutverlust signifikant niedriger als in der Placebogruppe. Bei der Patientengruppe mit regulärer Aprotiningabe ( $2 \times 10^6$  KIU gefolgt von  $0,5 \times 10^6$  KIU/Std.) lagen der Transfusionsbedarf signifikant und der Blutverlust hochsignifikant niedriger als in der Placebogruppe. Keine signifikanten Unterschiede in Transfusionsbedarf und Blutverlust konnten zwischen hochdosiert und regulär dosierter Aprotiningabe beobachtet werden.

Diese Ergebnisse (276) bestätigen die klinische Bedeutung einer intraoperativen Aprotinininfusion mit Verminderung der gesteigerten Fibrinolyse und des hohen Transfusionsbedarfs bei OLT und zeigen zusätzlich, daß dazu eine niedrige bzw. reguläre Aprotinindosierung ausreichend ist.

### **6.3. Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion während orthotoper Lebertransplantation**

#### **6.3.1. Einfluß der Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion auf die Thrombozytenfunktion bei orthotoper Lebertransplantation**

##### **6.3.1.1. Einleitung**

Bei der OLT sind eine gestörte postreperfusionelle Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten und ein Abfall der Thrombozytenzahl mitverantwortlich an dem hohen Transfusionsbedarf (5.5.1.,125). Die gleiche Störung der thrombozytären Aggregationsfähigkeit findet sich auch im Perfusat der Spenderleber (Kapitel 5.6.1.3.,125). Gleichzeitig konnten erhöhte Spiegel leukozytärer Mediatoren (5.4.1.) und Parameter einer ausgeprägten Prothrombinaktivierung in den Plasmaproben des Perfusates und der korrespondierenden Zirkulation (5.6.1.2.) gemessen werden (119,120,282,283,284). Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Mediatoren aus den während der Konservierungszeit ischämisch geschädigten Spenderleberzellen freigesetzt werden und zu einer Prothrombinaktivierung mit Inhibitorverbrauch und zur Thrombozytenaktivierung führen. Die Gabe von PGE<sub>1</sub> (18) hatte einen günstigen Einfluß bei ischämischer Leberschädigung gezeigt (6,88,261). Dieses geschieht durch Stabilisierung der zellulären Integrität, durch Beschleunigung von Reparaturprozessen und durch Steigerung der arteriellen Blutströmungsgeschwindigkeit zur Leber hin (105). Der Einsatz von Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), einem anderen zytoprotektiven Prostaglandin in der Konservierungslösung von Transplantaten, hatte ischämische Schädigungen des Transplantates verhindern können (96,219). Auch waren postoperative PGE<sub>1</sub> Infusionen bei der Therapie eines primären Lebertransplantatversagens wirksam gewesen (105). Bei fulminanter viraler Hepatitis hatte die PGE<sub>1</sub> Gabe die hepatische Synthesefunktion verbessern können und so zu einer langanhaltenden Remission geführt (301).

Die vorliegende Untersuchung prüft in einer offenen, prospektiven und randomisierten Studie den Einfluß der PGE<sub>1</sub> Infusion auf Thrombozytenfunktion und Transfusionsbedarf bei OLT (130,133).

In einer konsekutiven Serie wurden 20 Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung (Tab.22) transplantiert. Aprotinin wurde als kontinuierliche Infusion verabreicht (s.5.2.2.1.). Nach Zustimmung der Patienten erhielten 10 Patienten PGE<sub>1</sub> (Alprostadil, Sanol Schwarz GmbH, Monheim, Deutschland) als kontinuierliche Infusion (PG Gruppe). Zehn Patienten erhielten keine PGE<sub>1</sub> Behandlung (Kontrollgruppe). Mit Beginn der Operation wurde eine kontinuierliche Infusion von PGE<sub>1</sub> mit einer Anfangsdosis von 10µg/Std. gegeben, die gemäß Protokoll auf 10µg/Std. bis zu einer Maximaldosis von 40µg/Std. gesteigert wurde. Diese Enddosis wurde postoperativ für 3 Tage lang weiter gegeben. Die PGE<sub>1</sub> Infusion sollte unterbrochen werden, wenn der systolische Blutdruck unter 100 mmHg sinkt. Nach Blutdruckstabilisierung sollte erneut mit der Anfangsdosis von 10µg/Std. begonnen werden. Die PGE<sub>1</sub>-Gabe sollte abgebrochen werden, wenn PGE<sub>1</sub> dreimal innerhalb von 24 Stunden probiert und nicht toleriert wird oder wenn schwere Durchfälle auftreten.

**Tabelle 22:** Diagnose und Charakteristika von 20 Patienten mit primärer orthotoper Lebertransplantation

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>	<b>weibl.</b>	<b>männl.</b>	<b>Alter *</b>
<b>Postnekrotische Zirrhose</b>	12	7	5	45(30-63)
<b>Alkoholtoxische Zirrhose</b>	1	1	0	57
<b>Akute fulminante Hepatitis</b>	1	1	0	51
<b>Primäre biliäre Zirrhose</b>	3	3	0	50(41-61)
<b>Primäre sklerotische Cholangitis</b>	3	0	3	48(26-57)
<b>Total</b>	20	12	8	46,5(26-63)

\*Median (Spannbreite) in Jahren

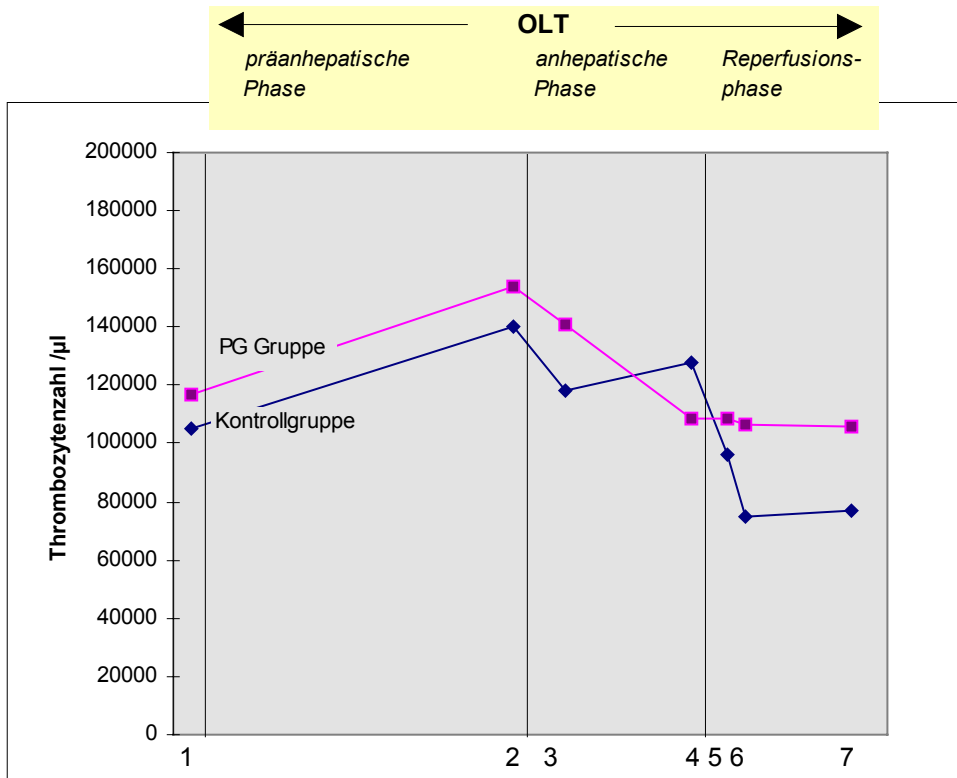
### 6.3.1.2. Ergebnisse

Der intraoperative Transfusionsbedarf (Median (Spannweite)) betrug 13 (8-26) Einheiten bei der PG Gruppe und 14 (8-30) Einheiten bei der Kontrollgruppe (n.s.). Es war keine Retransplantation notwendig. Bei allen Patienten der PG Gruppe konnte die PGE<sub>1</sub> Infusion während der ganzen Operation gegeben werden mit einer medianen Maximaldosis (SD) von 30(±10)µg/Std..

Die Thrombozytenzahl fiel signifikant mit beginnender Reperfusion in der Kontrollgruppe ab. Dieses galt nicht für die PG Gruppe (Abb.79). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Bei der ADP-induzierten Plättchenaggregation waren die Parameter der thrombozytären Aggregationsfähigkeit - MA und AuC - in beiden Gruppen präoperativ vergleichbar. Während der OLT fielen MA und AuC in der Kontrollgruppe (Abb.84,85) signifikant nach Reperfusion ab. Zusätzlich konnte ein signifikanter Anstieg der ADP (2µmol/l)-induzierten Thrombozytenaggregation (MA) in der anhepatischen Phase gemessen werden (Abb.85). Bei der PG Gruppe kam es bei der niedrigeren ADP-Konzentration 15 Minuten nach Reperfusion zu einem Abfall von MA und AuC (Abb.84). Bei der höheren ADP-Konzentration war nur mit AuC ein postreperfusioneller Abfall der Aggregationsfähigkeit zu messen (Abb.85). Der Vergleich beider Gruppen zeigte für beide ADP Konzentrationen statistisch signifikant höhere Werte der MA und AuC 5 (außer AuC in ADP (1µmol/l)), 15 und 60 Minuten nach Reperfusion für die PG Gruppe (Abb.84,85). Die MA und AuC der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in der Kontrollgruppe fiel für beide Kollagenkonzentrationen signifikant nach Reperfusion ab (Abb.86,87). Bei der PG Gruppe konnten keine signifikanten Abfälle der thrombozytären Aggregationsfähigkeit (MA, AuC) bestimmt werden (Abb.86,87). Nur AuC bei einer Kollagenkonzentration von 1µg/ml zeigte einen postreperfusionellen Abfall (Abb.87). Der Vergleich beider Gruppen erbrachte für die niedrigere Kollagenkonzentration signifikant höhere Werte der MA und/oder AuC zu Beginn der anhepatischen Phase und 5 bis 60 Minuten nach Reperfusion bei der PG Gruppe (Abb.86). Bei den höheren Kollagenkonzentrationen erreichte dieser Unterschied 5 und 60 Minuten nach Reperfusion Signifikanz (Abb.87).

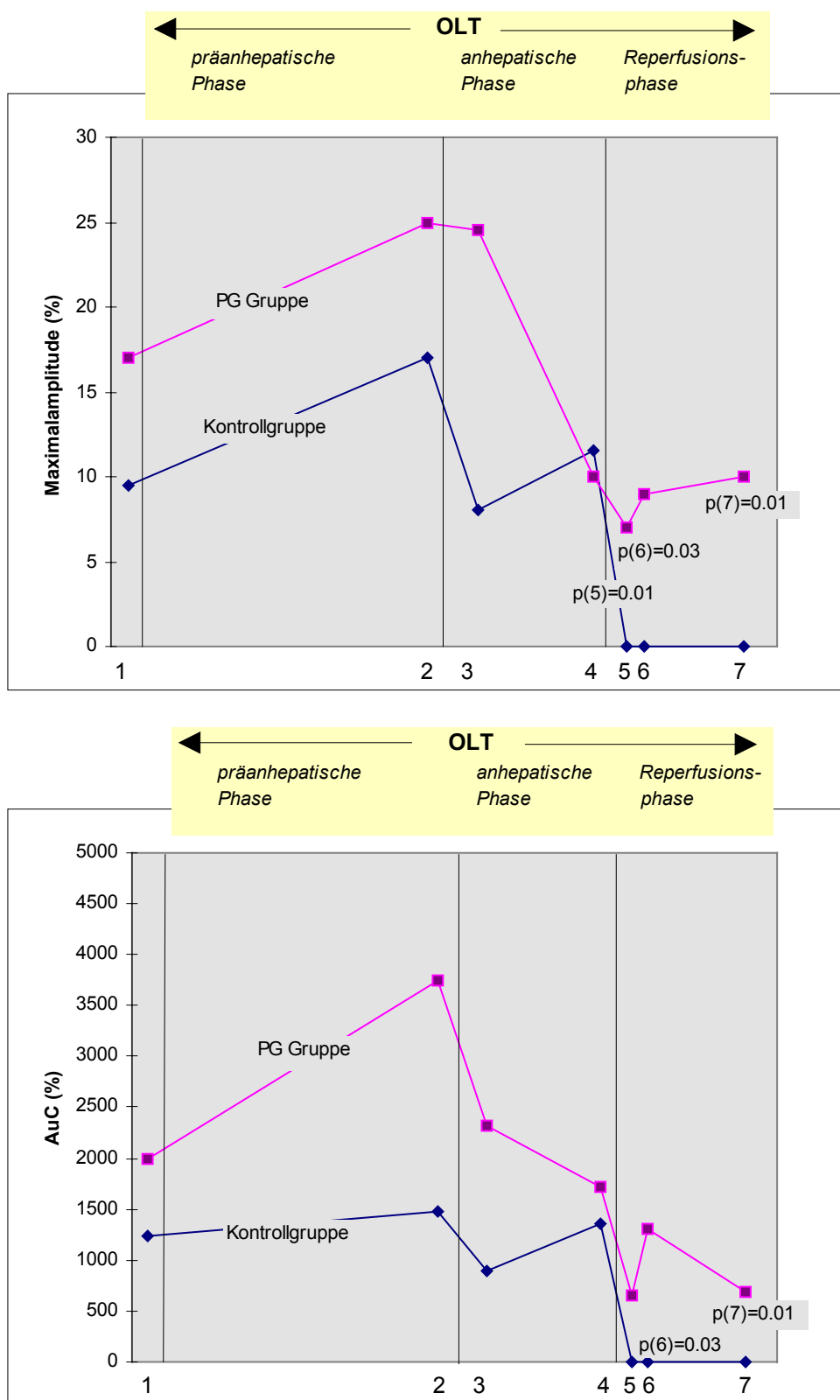
Bei der Ristocetin-getriggerten Plättchenaggregation war ein Ansteigen der MA und AuC Werte in der anhepatischen Phase nur bei der Kontrollgruppe zu sehen (Abb.88). Nach Reperfusion kam es bei der Kontrollgruppe zum signifikanten Abfall von MA und AuC. Bei



**Abbildung 83:** Thrombozytenzahl während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden zu keinem Zeitpunkt.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
Thrombozytenzahl/µl <b>Kontrollgruppe</b>	40.000- 266.000	62.000- 208.000	59.000- 227.000	69.000- 246.000	49.000- 135.000	37.000- 125.000	26.000- 149.000
Thrombozytenzahl/µl <b>PG Gruppe</b>	59.000- 245.000	85.000- 254.000	67.000- 279.000	60.000- 217.000	62.000- 242.000	62.000- 252.000	68.000- 233.000

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
<b>Kontrollgruppe</b>	p(4/5)=0.0117	p(4/6)=0.0117	p(5/6)=0.0117
<b>PG Gruppe</b>			

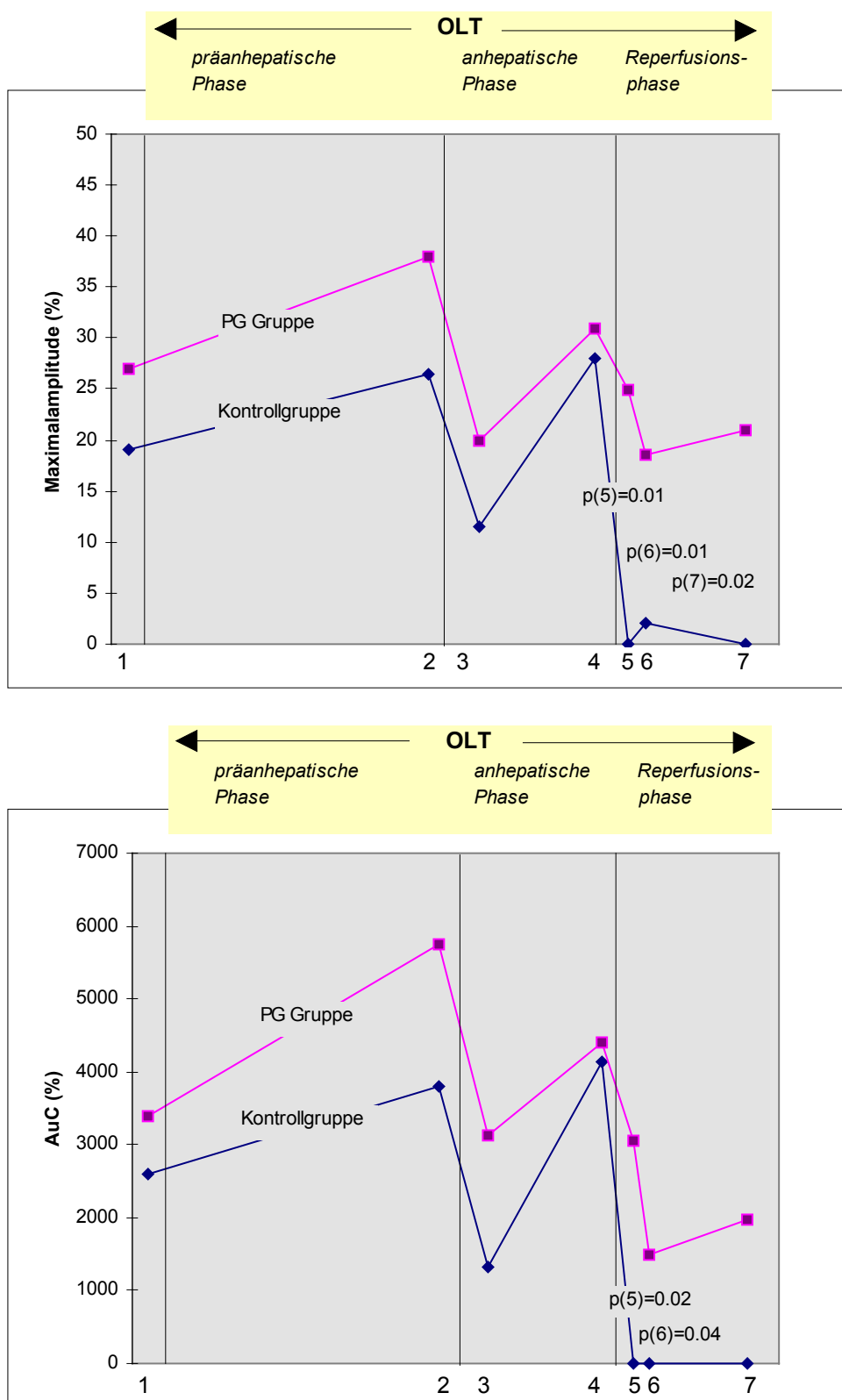


**Abbildung 84:** Maximalamplitude (MA) und Fläche unter der Aggregationskurve (AuC, area under the curve) bei Adenosindiphosphat (ADP) ( $1\mu\text{mol/l}$ )-induzierter Thrombozytenaggregation während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin  $\text{E}_1$  Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin  $\text{E}_1$  Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in der jeweiligen Abbildung angegeben.



Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
<b>Kontrollgruppe</b>							
MA in %	0-34	1-48	0-24	0-73	0-19	0-27	0-25
AuC in %	0-4871	0-6812	0-2368	0-10119	0-1884	0-3423	0-3800
<b>PG Gruppe</b>							
MA in %	3-81	0-84	0-49	1-48	0-54	0-31	0-75
AuC in %	532-11067	0-10225	0-8331	0-7845	0-7810	0-4763	0-6164

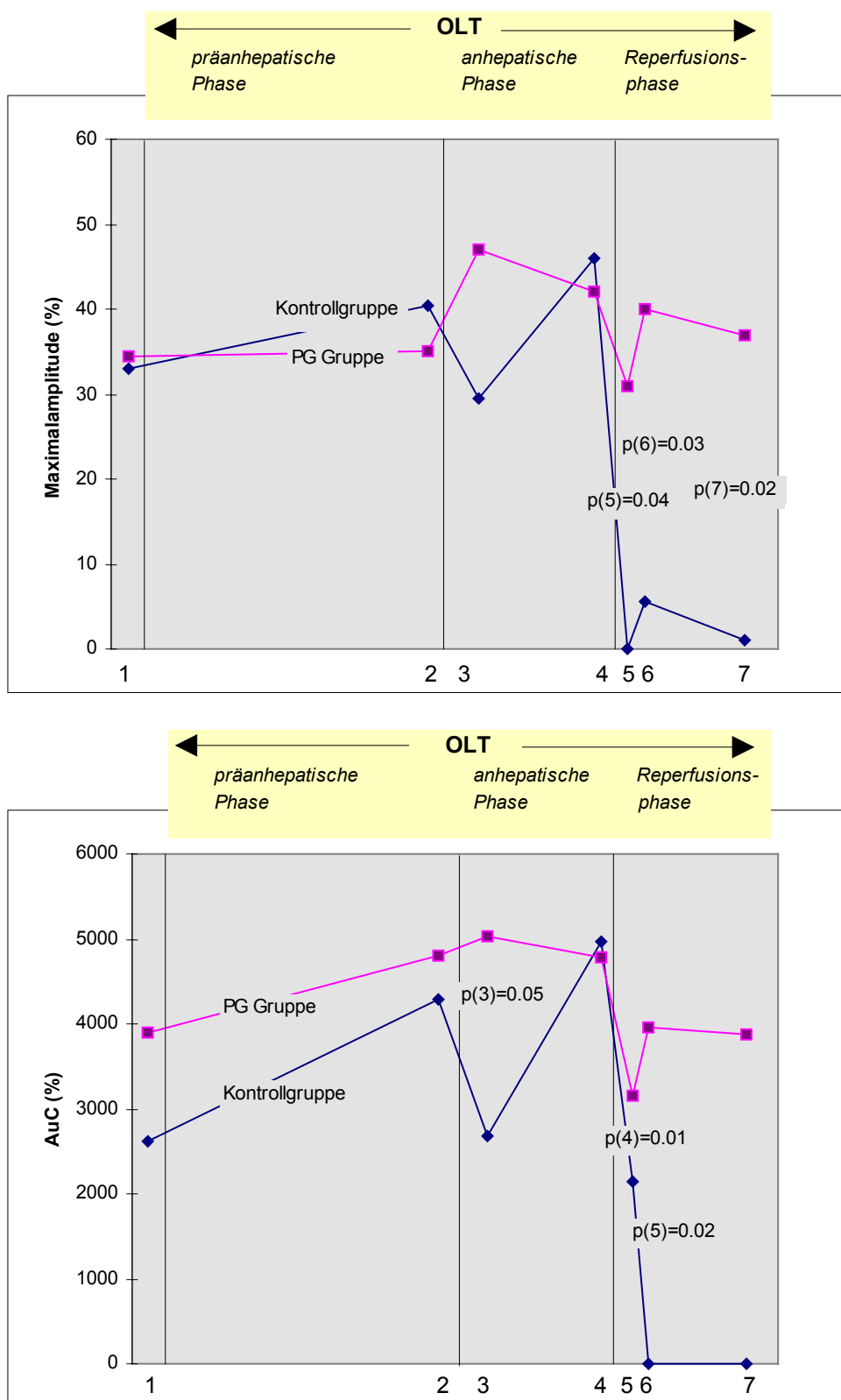
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf		
MA ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(4/5)=0.0117	p(4/6)=0.0117
MA ( <b>PG Gruppe</b> )		p(5/6)=0.0284
AuC ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(4/5)=0.0209	p(6/7)=0.0209
AuC ( <b>PG Gruppe</b> )		p(6/7)=0.0382



**Abbildung 85:** Maximalamplitude (MA) und Fläche unter der Aggregationskurve (AuC, area under the curve) bei Adenosindiphosphat (ADP) ( $2\mu\text{mol/l}$ )-induzierter Thrombozytenaggregation während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin  $E_1$  Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin  $E_1$  Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in der jeweiligen Abbildung angegeben.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
<b>Kontrollgruppe</b>							
MA in %	5-60	7-62	0-38	3-70	0-61	0-25	0-34
AuC in %	248-8332	313-8238	0-5640	0-10985	0-9399	0-3609	0-5461
<b>PG Gruppe</b>							
MA in %	6-80	8-83	2-78	6-50	3-48	1-45	0-74
AuC in %	852-12504	1003-12681	222-11411	545-7756	29-7047	0-7074	0-10726

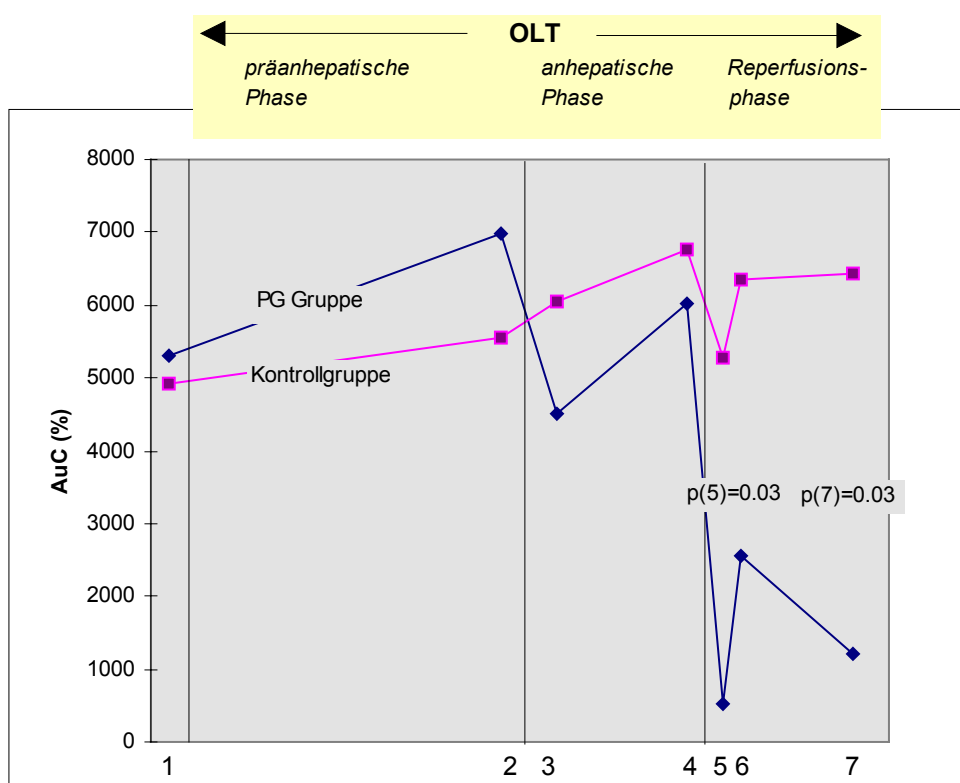
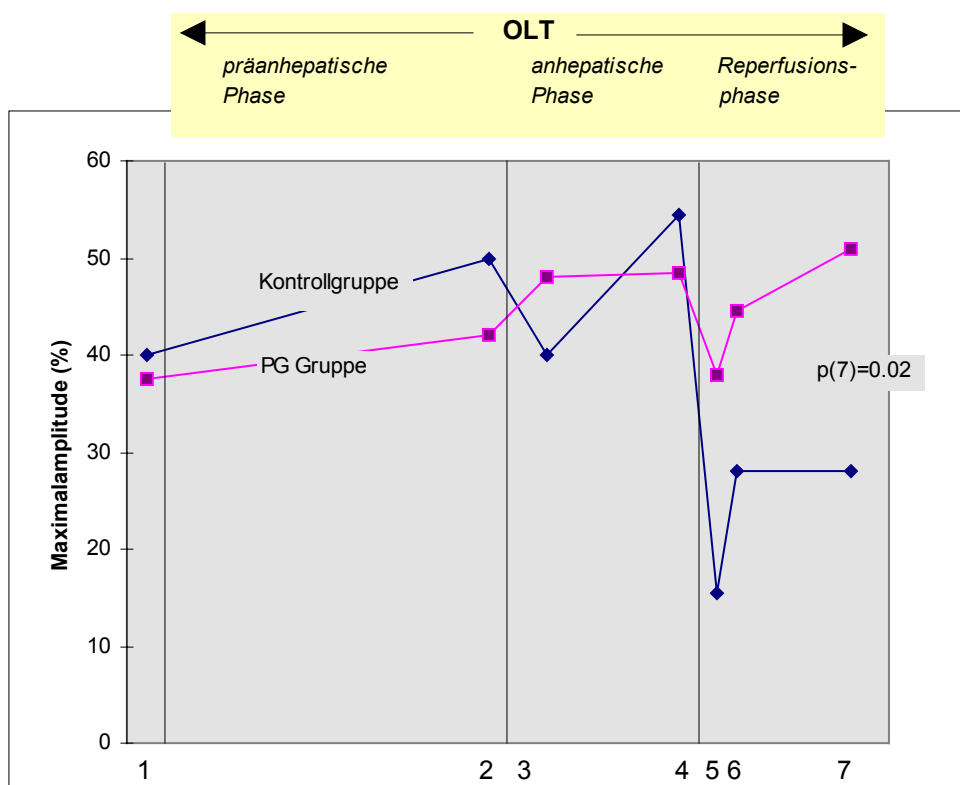
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
MA ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(3/4)=0.0469	p(4/5)=0.0051	p(4/6)=0.0077	p(4/7)=0.0244
MA ( <b>PG Gruppe</b> )		p(4/5)=0.0218	p(4/6)=0.0284	
AuC ( <b>Kontrollgruppe</b> )		p(4/5)=0.0357	p(4/6)=0.0173	
AuC ( <b>PG Gruppe</b> )		p(4/5)=0.0357	p(4/6)=0.0173	



**Abbildung 86:** Maximalamplitude (MA) und Fläche unter der Aggregationskurve (AuC, area under the curve) bei Kollagen ( $0,5\mu\text{g/ml}$ )-induzierter Thrombozytenaggregation während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin  $E_1$  Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin  $E_1$  Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in der jeweiligen Abbildung angegeben.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
Kontrollgruppe							
MA in %	0-74	18-66	21-63	5-68	0-62	0-56	0-60
AuC in %	0-10083	2398-8978	0-6586	0-10126	0-8472	0-6698	0-7881
PG Gruppe							
MA in %	15-79	16-86	20-84	18-76	11-78	10-94	16-82
AuC in %	1529-13422	1952-15039	2471-14681	2463-11799	802-11871	636-15287	1930-12976

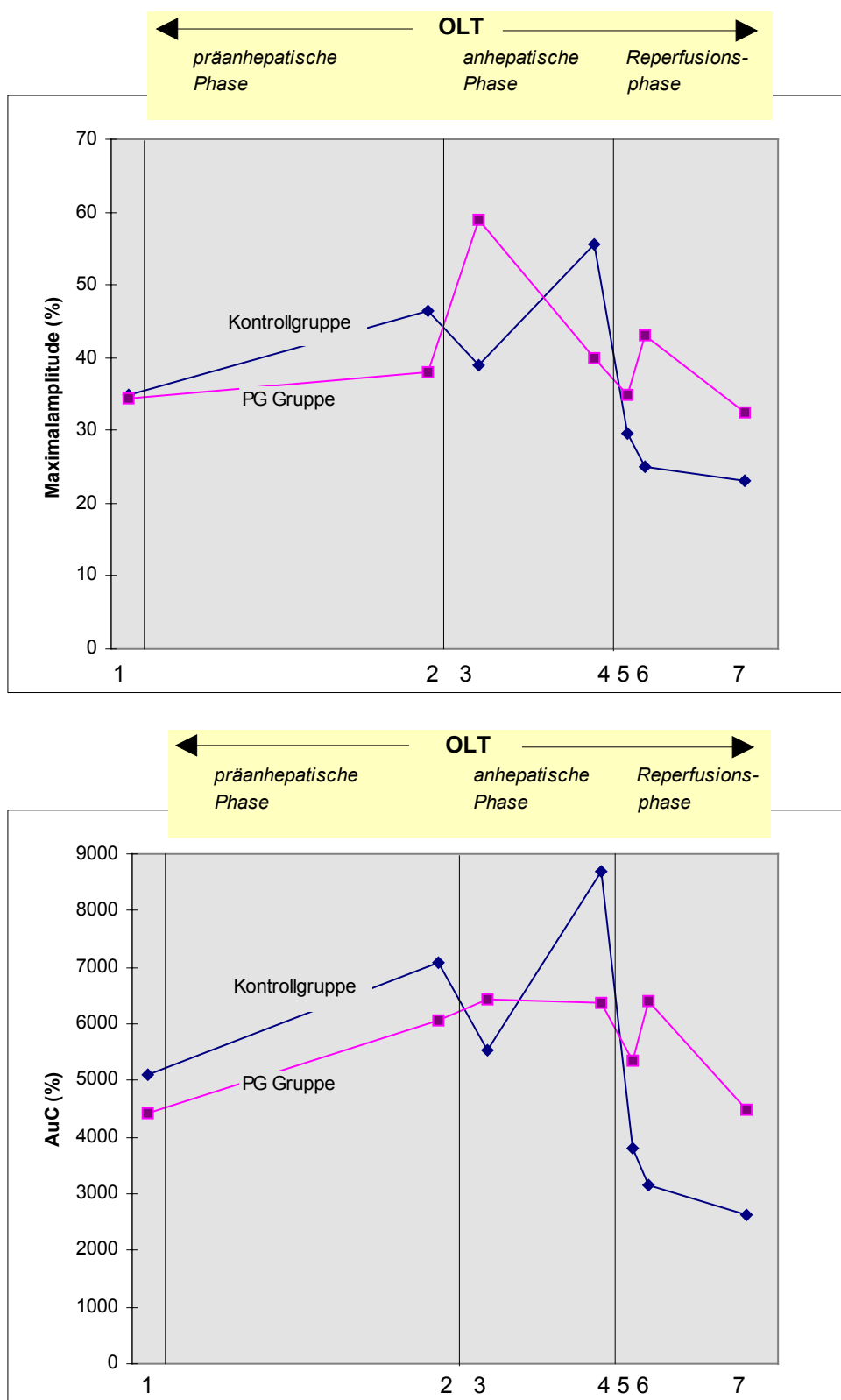
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf		
MA (Kontrollgruppe)	p(4/5)=0.0077	p(4/6)=0.0077
MA (PG Gruppe)		
AuC (Kontrollgruppe)	p(4/5)=0.284	p(4/6)=0.0384
MA (PG Gruppe)		



**Abbildung 87:** Maximalamplitude (MA) und Fläche unter der Aggregationskurve (AuC, area under the curve) bei Kollagen (1µg/ml)-induzierter Thrombozytenaggregation während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in der jeweiligen Abbildung angegeben.

Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
<b>Kontrollgruppe</b>							
MA in %	26-69	19-81	31-67	0-74	0-64	0-67	0-64
AuC in %	795-10058	2712-10126	2642-8656	0-10996	0-9442	0-9110	0-9526
<b>PG Gruppe</b>							
MA in %	18-86	18-89	25-87	22-84	16-83	18-93	27-87
AuC in %	2485-15615	2683-15581	3054-15250	3605-13440	1705-12866	2833-15241	2808-13788

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
MA ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(4/5)=0.0077	p(4/6)=0.0152	p(4/7)=0.0209
MA ( <b>PG Gruppe</b> )			
AuC ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(4/5)=0.0077	p(4/6)=0.0109	p(4/7)=0.0173
AuC ( <b>PG Gruppe</b> )	p(4/5)=0.0173		

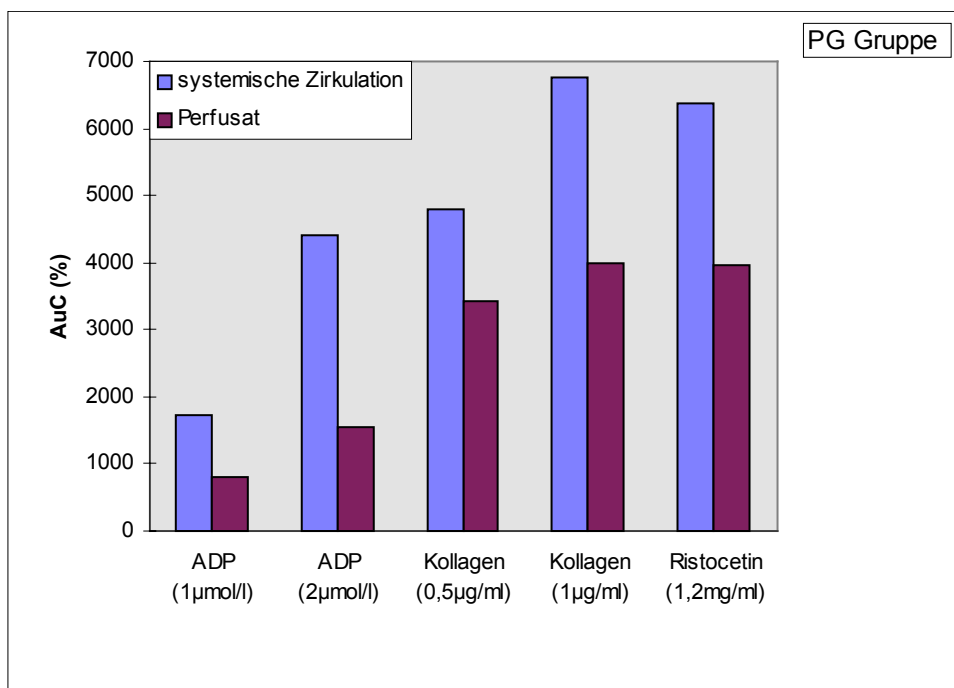
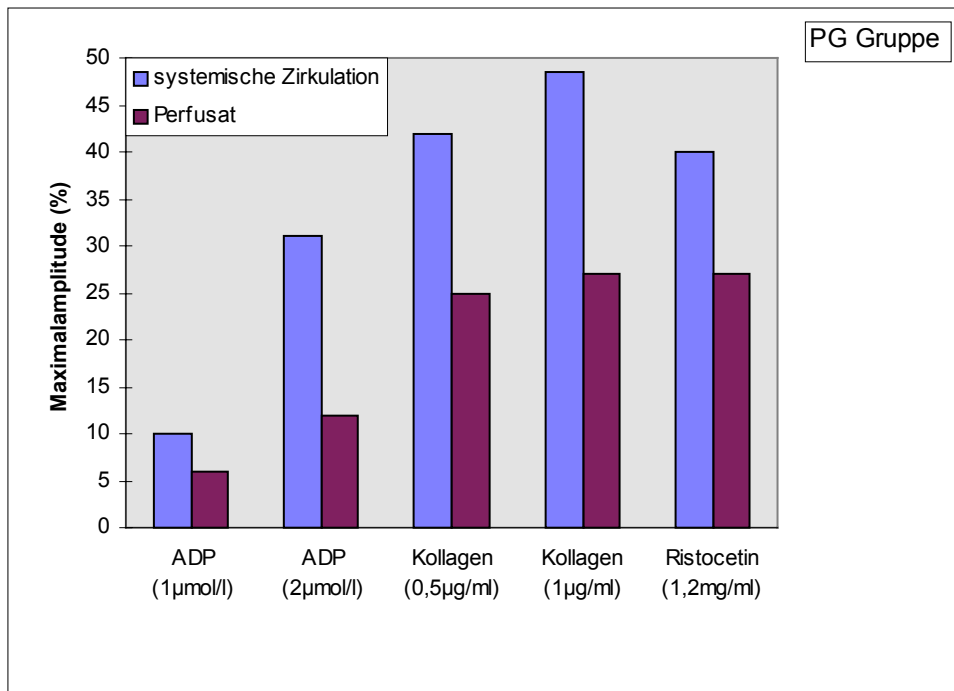


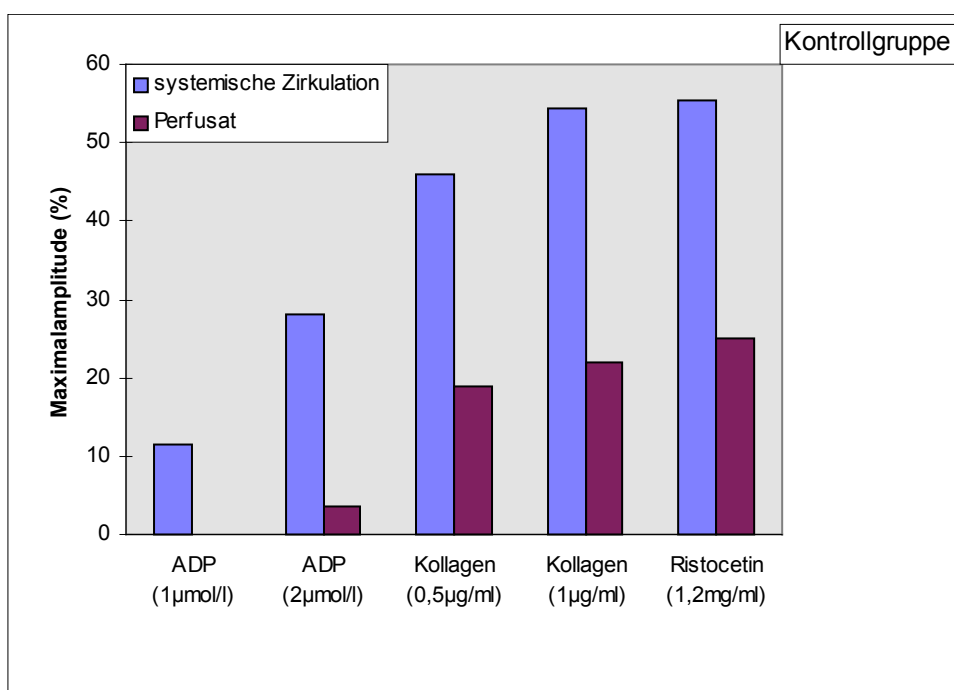
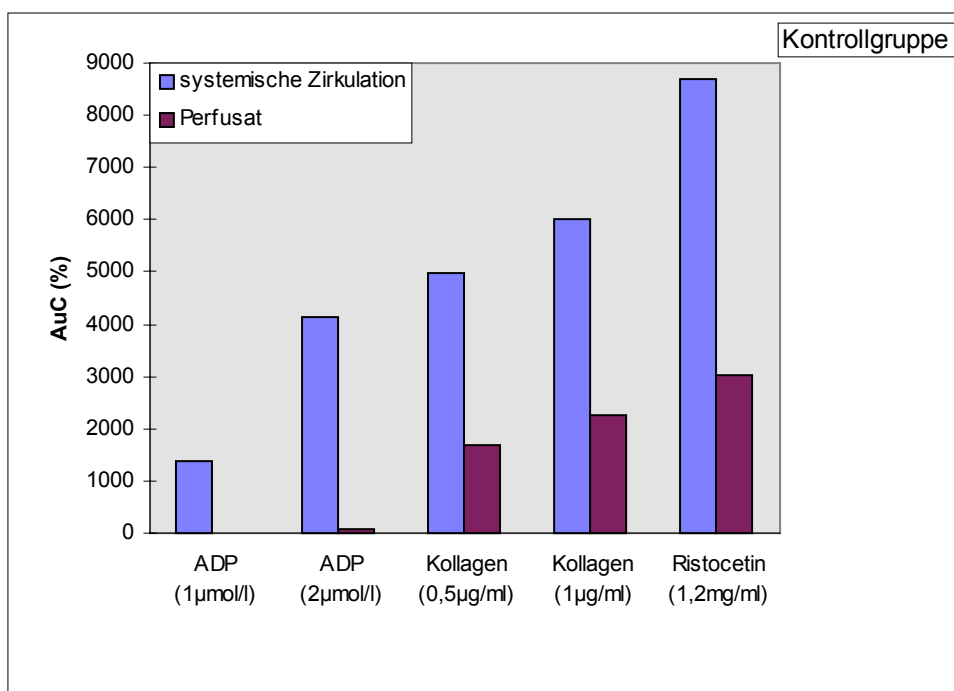
**Abbildung 88:** Maximalamplitude (MA) und Fläche unter der Aggregationskurve (AuC, area under the curve) bei Ristocetin (1,2mg/ml)-induzierter Thrombozytenaggregation während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht.



Spannweiten							
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7
<b>Kontrollgruppe</b>							
MA in %	0-74	18-80	13-68	44-83	0-64	0-46	8-62
AuC in %	0-11904	2664-11738	2006-10186	6012-11967	0-9924	0-7456	1042-9574
<b>PG Gruppe</b>							
MA in %	6-95	15-91	0-93	18-84	0-88	11-101	18-77
AuC in %	655-16528	1821-15796	0-16300	2327-14158	0-14795	1239-17418	2001-10020

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
MA ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(3/4)=0.0284	p(4/5)=0.0069	p(4/6)=0.0051	p(4/7)=0.0077
MA ( <b>PG Gruppe</b> )				
AuC ( <b>Kontrollgruppe</b> )	p(3/4)=0.0093	p(4/5)=0.0069	p(4/6)=0.0051	p(4/7)=0.0109
AuC ( <b>PG Gruppe</b> )		p(4/5)=0.0284		





**Abbildung 89:** Maximalamplitude (MA) und Fläche unter der Aggregationskurve (AuC, area under the curve) bei Adenosinphosphat- (ADP) (1µmol/l, 2µmol/l), Kollagen-(0,5µg/l, 1µg/l) und Ristocetin- (1,2mg/ml) induzierter Thrombozytenaggregation im Perfusat (P) und der korrespondierenden systemischen Zirkulation (S) während orthotoper Lebertransplantation bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe).

Spannweiten				
	Kontrollgruppe		PG Gruppe	
	Perfusat	systemisch	Perfusat	systemisch
MA (ADP 1 $\mu$ mol/l) (%)	0-54	0-73	0-68	1-48
MA (ADP 2 $\mu$ mol/l) (%)	0-60	3-70	0-72	6-50
MA (Kol.0,5 $\mu$ g/ml) (%)	0-62	5-68	0-79	18-76
MA (Kol.1,0 $\mu$ g/ml) (%)	0-57	0-74	0-76	22-84
MA (Ris.1,2mg/ml) (%)	0-65	44-83	0-81	18-84
AuC (ADP 1 $\mu$ mol/l) (%)	0-10119	0-8657	0-10415	595-7756
AuC (ADP 2 $\mu$ mol/l) (%)	0-9133	0-10985	0-10072	538-7845
AuC (Kollagen 0,5 $\mu$ g/ml) (%)	0-10576	0-10126	0-13465	2463-11799
AuC (Kollagen 1 $\mu$ g/ml) (%)	0-9991	0-10996	0-12306	3605-13440
AuC (Ristocetin 1,2mg/ml) (%)	0-10052	6012-11967	0-13419	2327-14158

**Signifikante Unterschiede zwischen Werten in der systemischen Zirkulation und Perfusat p(S/P):**

	ADP (1 $\mu$ mol/l)	ADP (2 $\mu$ mol/l)	Kollagen ( 0,5 $\mu$ g/ml)	Kollagen (1 $\mu$ g/ml)	Ristocetin (1,2mg/ml)
<b>PG Gruppe</b>					
MA	0.0117	0.0051	0.0077	0.0077	0.0080
AuC	0.0284	0.0284	n.s.	0.0077	0.0125
<b>Kontrollgruppe</b>					
MA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
AuC	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

der PG Gruppe fiel nur MA unmittelbar nach Reperfusion signifikant ab (Abb.88). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erreichten kein Signifikanzniveau.

Im Perfusat der Kontrollgruppe lagen im Vergleich zu systemischen Werten MA und AuC der ADP-, Kollagen- und Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation signifikant niedriger (Abb.89) mit Ausnahme der Kollagen-(0,5µg/ml) induzierten Aggregation. Bei der PG Gruppe bestanden für alle Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen Perfusatwerten und systemischen Spiegeln. Der Vergleich zwischen PG Gruppe und Kontrollgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede.

### 6.3.1.3. Diskussion

PGE<sub>1</sub> wird bei physiologischem pH und Raumtemperatur rasch inaktiviert (244), sodaß ex vivo kein direkter PGE<sub>1</sub> Effekt die Messung der thrombozytären Aggregationsfähigkeit im PRP beeinflusst. In vivo führt die PGE<sub>1</sub> Infusion dosisabhängig zu einer Verminderung der Plättchenaggregation und Plättchenfreisetzungsreaktion (42,81,176). Diese geschieht durch seine Bindung an Rezeptorproteine und durch intrazelluläre Erhöhung des cAMP (302).

Bei Patienten, die während OLT keine PGE<sub>1</sub> Infusion erhielten, konnte mit Beginn der Reperfusionsphase ein signifikanter Abfall der ADP-, Kollagen- und Ristocetin-induzierten Aggregationsfähigkeit gemessen werden. Parallel fiel die Thrombozytenzahl signifikant ab. Diese Ergebnisse bestätigten die Voruntersuchungen (125,262, Kapitel 5.5.).

Wurde intraoperativ PGE<sub>1</sub> infundiert, konnte der postreperfusionelle Abfall der thrombozytären Aggregationsfähigkeit größtenteils verhindert werden. In der ADP-induzierten Plättchenaggregation waren die Abfälle verspätet (ADP 1µmol/l) oder fehlten (MA bei ADP 2µmol/l). Auch bei der Kollagen (1µg/ml)- und Ristocetin-getriggerten Aggregation kam es zu keinen Abfällen der Aggregationsfähigkeit mit Reperfusionsbeginn. Parallel konnte kein Abfall der Thrombozytenzahl gemessen werden. Der Gruppenvergleich erreichte ein Signifikanzniveau nach Reperfusion (Kollagen (1µg/ml) und Ristocetin) bzw. während der ganzen Operation (ADP (1µmol/l und 2µmol/l) und Kollagen (0,5 µg/ml)).

Die thrombozytäre Aggregationsfähigkeit im Perfusat der Kontrollgruppe war deutlich niedriger als in der korrespondierenden systemischen Zirkulation während sie sich bei der PG Gruppe nicht von den Werten in der systemischen Zirkulation unterschied.

Die Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen eines postreperfusionellen Abfalls von Plättchenzahl und Aggregationsfähigkeit in der systemischen Zirkulation und im Perfusat (125, Kapitel 5.5. und 5.6.). Darüberhinaus konnte erstmalig gezeigt werden, daß ein solcher Abfall durch intraoperative Gabe von PGE<sub>1</sub> Infusion verhindert werden kann.

Während des Flushings der Spenderleber passiert arterielles Blut das ischämisch geschädigte Gefäßbett der Spenderleber. Es ist vorstellbar, daß es dadurch zur Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Plättchenadhäsion und Aggregation kommt. Die verminderte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten im Perfusat könnte somit erklärt werden. PGE<sub>1</sub> scheint diese Thrombozytenaktivierung in der Spenderleber zu reduzieren.

Das gleichzeitige Vorkommen von hohen Spiegeln leukozytärer Mediatoren in Perfusat und korrespondierender Zirkulation macht die Rolle einer Leukozytenaktivierung in der Pathogenese der gesteigerten Gerinnungsaktivierung und der verminderten Thrombozytenfunktion wahrscheinlich (119,120,141,282,283,284). Übereinstimmend konnte mit Beginn der Reperfusion eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten und Lymphozyten in

der Spenderleber festgestellt werden (50,320). Da PGE<sub>1</sub> in der Lage ist, die Adhäsion der Leukozyten (160) und die lysosomale Freisetzung von Neutrophilen (84) herabzusetzen, ist auch an eine therapeutische Wirksamkeit von PGE<sub>1</sub> auf diesem Wege zu denken.

Der geringfügige bzw. verzögerte postreperfusionelle Abfall der thrombozytären Aggregationsfähigkeit in der PG Gruppe läßt sich durch den aggregationshemmenden Einfluß der UW-Lösung erklären (vgl.Kapitel 5.5.2.; 121,122).

Spätere Untersuchungen (68) bestätigten, daß PGE<sub>1</sub> Gabe die ischämisch bedingte Schädigung des Endothels postreperfusionell reduziert.

Die Transfusionsrate unterschied sich statistisch nicht zwischen beiden Gruppen.

### **6.3.2. Einfluß der Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion auf die Hämostase**

#### **6.3.2.1. Einleitung**

Es gibt Hinweise, daß die Gabe von PGE<sub>1</sub> Infusion einen Einfluß auf das Fibrinolyse- und Gerinnungssystem hat (66, 327, 331, 335). Es war daher zu klären, ob eine PGE<sub>1</sub> Infusion während OLT einen Einfluß auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System ausübt.

In einer offenen, prospektiven und randomisierten Studie wurde der Einfluß einer intraoperativen PGE<sub>1</sub> Therapie auf die Parameter des Fibrinolyse- und Gerinnungssystems untersucht. Das Patientenkollektiv (Tab.22) und die PGE<sub>1</sub> Applikation entsprechen den unter 6.3.1.1. gemachten Angaben.

#### **6.3.2.2. Ergebniss**

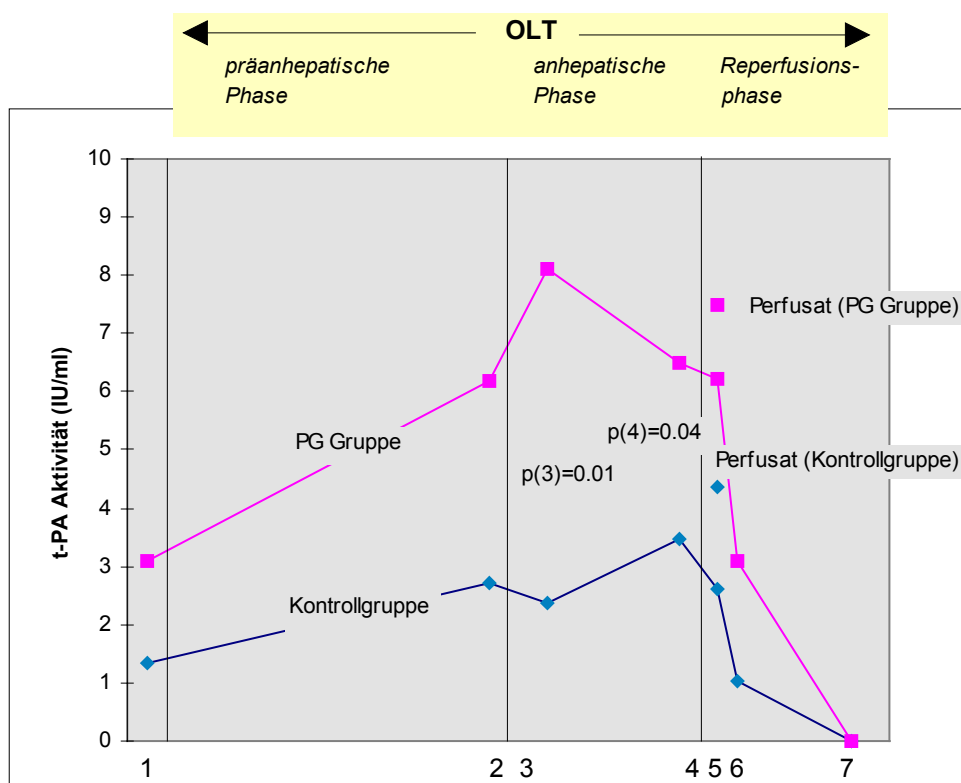
Im TEG konnten bei allen 20 OLTs keine Zeichen einer Hyperfibrinolyse (WBLT) festgestellt werden.

Die t-PA und PAI Aktivitäten (Abb.90,91) fielen bei der Kontrollgruppe mit Beginn der Reperfusion und bei der PG Gruppe (bei insgesamt höheren t-PA Werten) 10 Minuten später signifikant ab.

Die Plasminogenkonzentration (Abb.92) zeigte bei der Kontrollgruppe in präanhepatischer und anhepatischer Phase und frühen Reperusionsphase einen signifikanten Abfall, während bei der PG Gruppe dies nur postreperfusionell der Fall war.

Die u-PA Ag Spiegel (Methode nach Gaubius Institut, Leiden, s.3.3.1.) (Abb.93) nahmen bei der Kontrollgruppe signifikant mit Reperfusion ab, während ein Abfall bei der PG Gruppe erst 60 Minuten nach Reperfusion signifikant wurde. Die scu-PA Spiegel (Leiden) (Abb.94) zeigten bei der Kontrollgruppe einen kurzen Abfall mit beginnender anhepatischer Phase gefolgt von einem Anstieg während der anhepatischen Phase und einem Abfall nach Reperusionsbeginn. Bei der PG Gruppe war ein Abfall der scu-PA Werte in der präanhepatischen Phase die einzige signifikante Veränderung während der OLT. Die tcu-PA Werte (Leiden) (Abb.95) bei der Kontrollgruppe verliefen parallel zu den scu-PA Werten mit einem signifikanten Abfall zu Beginn der anhepatischen Phase mit nachfolgendem Anstieg und erneutem Abfall mit Reperusionsbeginn. Bei der PG Gruppe kam es zum Abfall der tcu-PA Werte in der präanhepatischen Phase und nach Reperusionsbeginn.

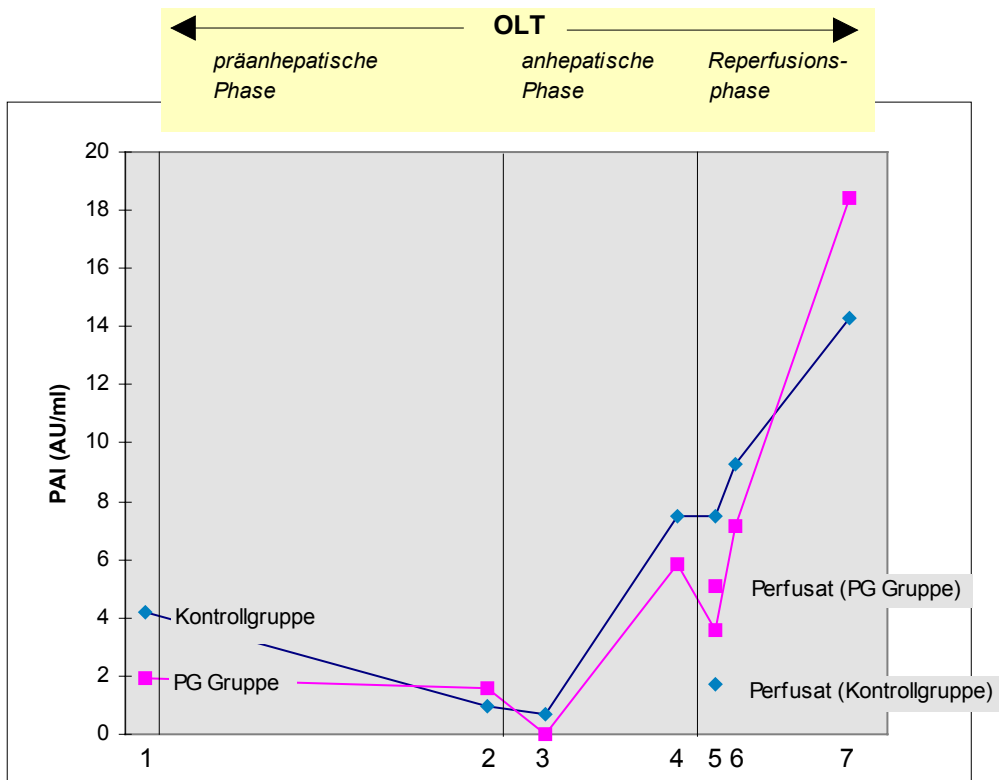
Die  $\alpha_2$ -Antiplasminaktivität (Abb.96) zeigte bei beiden Gruppen einen Anstieg in präanhepatischer und anhepatischer Phase gefolgt von einem Abfall mit Reperfusion. Vor und



**Abbildung 90:** t-PA (tissue-type Plasminogenaktivator) Aktivität während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind in der Abbildung angegeben.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
t-PA (IU/ml)	0-4,35	0-26,8	0,28-19,1	1,3-14,3	0,36-16,5	0-10,5	0-7,05	1,3-16,2
<b>Kontrollgruppe</b>								
t-PA (IU/ml)	1,21-36	1,8-26,8	3,45-16,6	3-17,4	0-29	0-27,3	0-4,56	3,6-18,3
<b>PG Gruppe</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
<b>Kontrollgruppe</b>	p(4/5)=0.0312	p(5/6)=0.0005	p(4/P)=0.0312
<b>PG Gruppe</b>		p(5/6)=0.0277	p(6/7)=0.0425

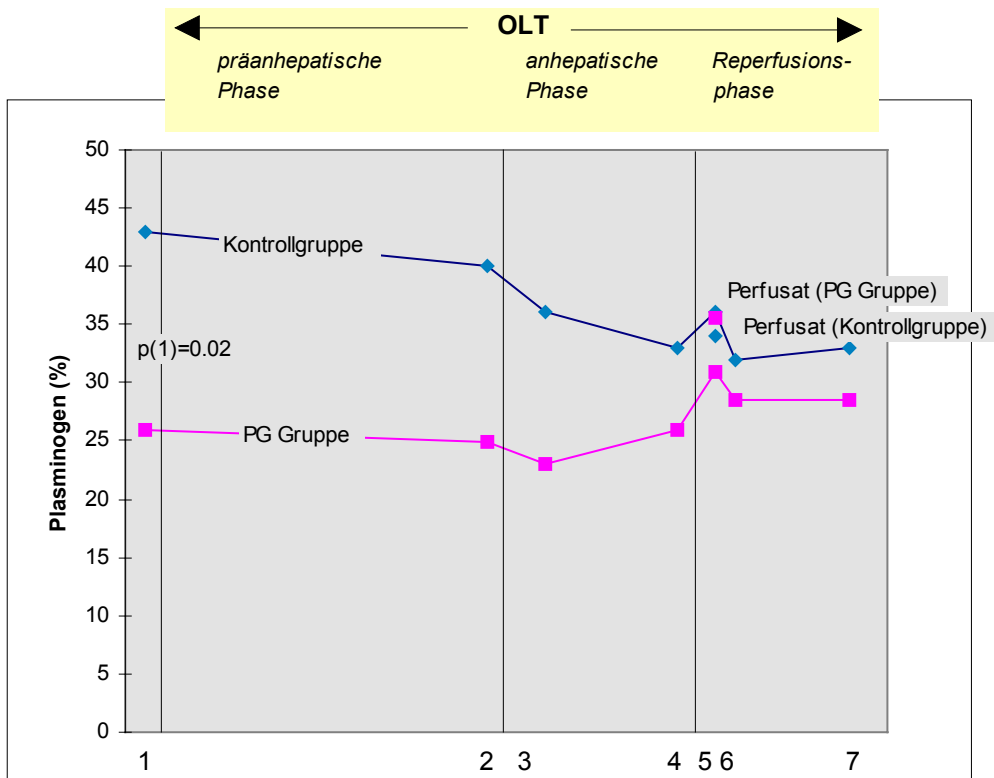


**Abbildung 91:** PAI (Plasminogenaktivatorinhibitor) Aktivität während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
PAI (AU/ml) <b>Kontrollgruppe</b>	0-50	0-15,6	0-14,2	0-13,2	0-13,2	0-15,2	6,3-79,2	0-11,4
PAI (AU/ml) <b>PG Gruppe</b>	0-4,8	0-11	0-7,6	0-8,3	0-13,6	0-26	7,3-106,8	0-8,1

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf		
Kontrollgruppe	p(5/6)=0.0186	p(6/7)=0.0019
PG Gruppe		p(6/7)=0.0117

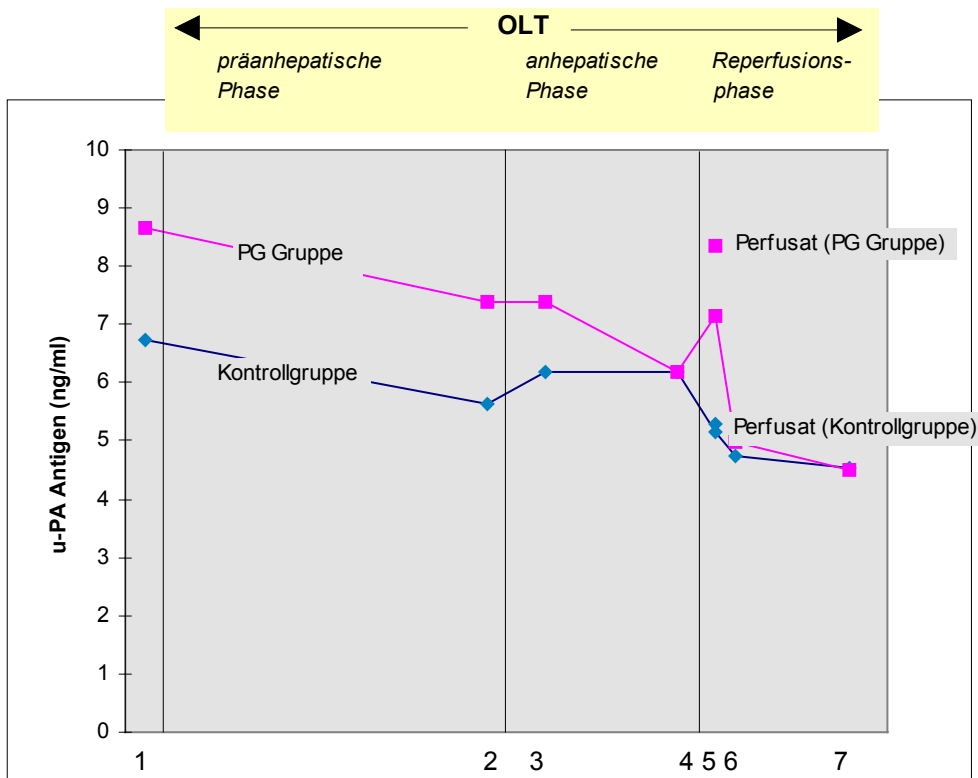




**Abbildung 92:** Plasminogen Aktivität während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind in der Abbildung angegeben.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
Plasminogen (%)	9-97	20-87	16-77	20-69	19-47	18-46	9-43	25-64
<b>Kontrollgruppe</b>								
Plasminogen (%)	2-44	16-50	18-49	15-47	24-53	22-47	23-59	22-61
<b>PG Gruppe</b>								

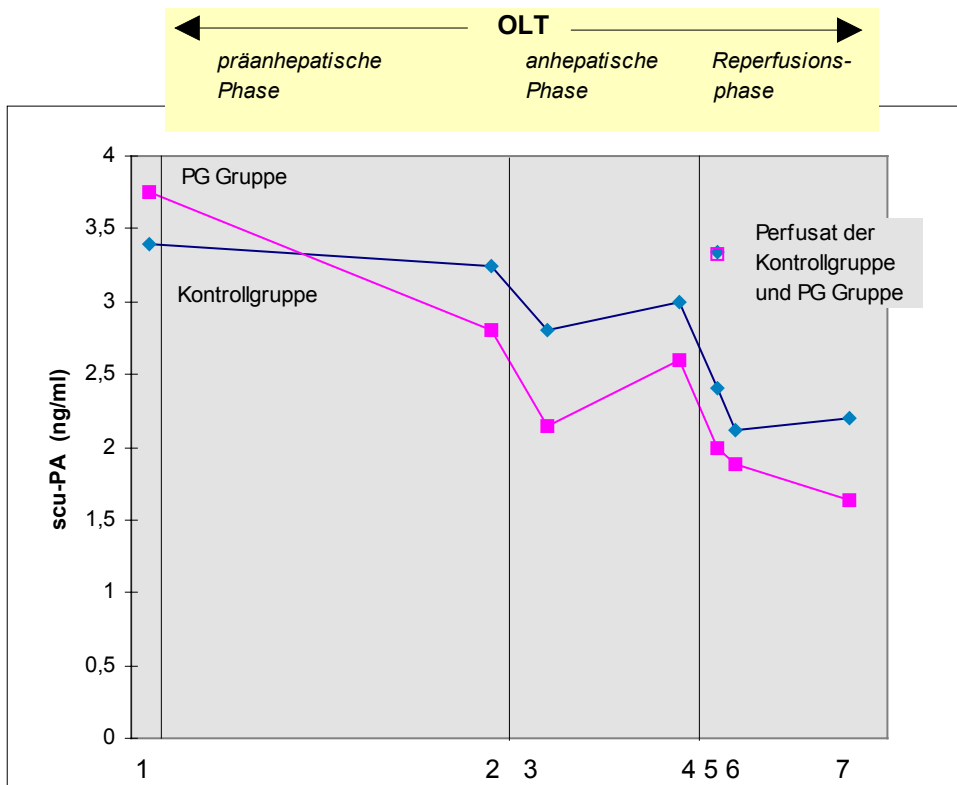
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf		
<b>Kontrollgruppe</b>	p(1/2)=0.0414	p(2/3)=0.0058
<b>PG Gruppe</b>		p(5/6)=0.0277



**Abbildung 93:** Konzentration von u-PA Ag (urokinase-type Plasminogenaktivator Antigen) während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
u-PA Ag (ng/ml) <b>Kontrollgruppe</b>	3-14,5	2,1-10,8	1,8-9	2,5-9,9	2,6-8,4	2,4-7,3	1,7-6,6	3-10,4
u-PA Ag (ng/ml) <b>PG Gruppe</b>	7,1-10,7	5,3-10,4	4,4-8,7	3,7-10,2	3,3-8,8	3,6-7,1	2,9-7,5	5-11,5

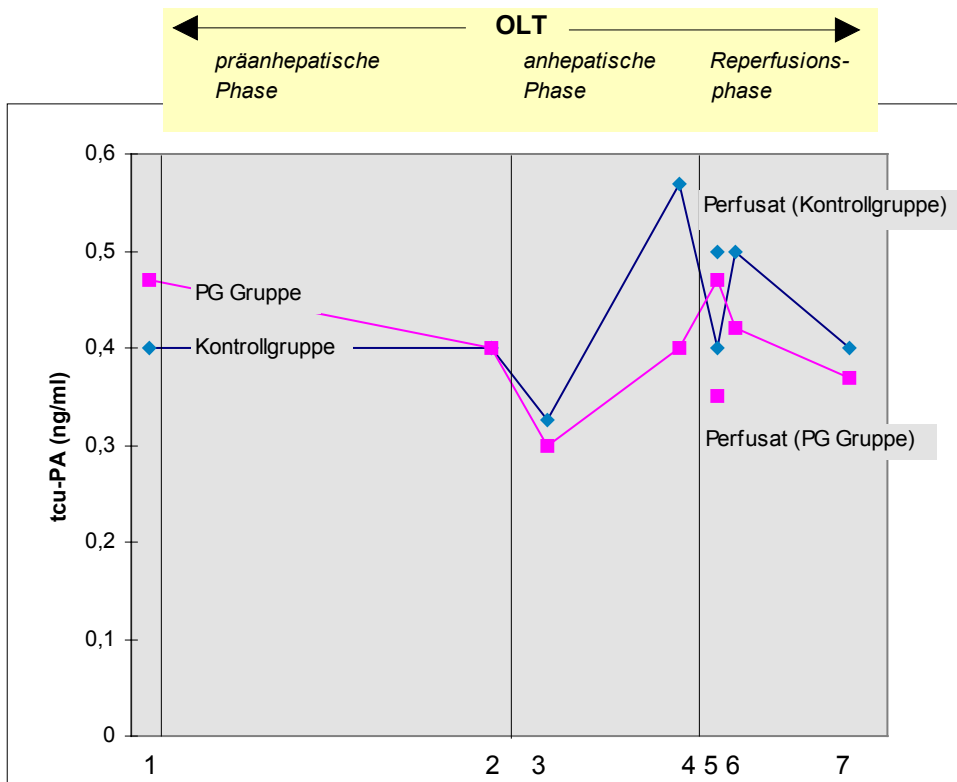
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf		
<b>Kontrollgruppe</b>	p(4/5)=0.0008	
<b>PG Gruppe</b>	p(6/7)=0.0499	p(4/P)=0.0277



**Abbildung 94:** Konzentration von scu-PA (single chain urokinase-type Plasminogenaktivator) während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
scu-PA (ng/ml)	0-6,4	1,8-6,9	1,3-5,5	1,8-6	1,7-5,1	1,32-4,8	0,6-5,6	0,8-8,4
<b>Kontrollgruppe</b>								
scu-PA (ng/ml)	0,8-7,2	1,8-5,1	1,4-4,7	1,5-5,5	1-5,1	1,1-3,5	0,3-4,1	1,4-6,4
<b>PG Gruppe</b>								

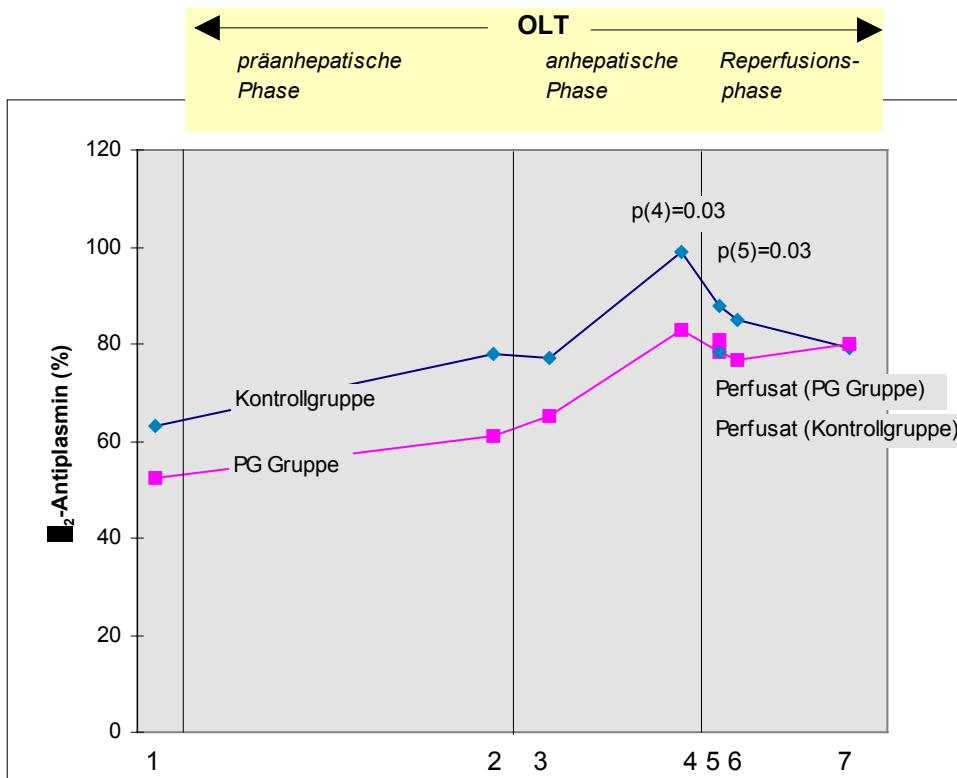
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
<b>Kontrollgruppe</b>	p(2/3)=0.0072	p(3/4)=0.0280	p(4/5)=0.0113	p(5/6)=0.0038
<b>PG Gruppe</b>	p(1/2)=0.0280			



**Abbildung 95:** Konzentration von tcu-PA (two chain urokinase-type Plasminogenaktivator) während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
tcu-PA (ng/ml)	0-1	0,2-0,9	0,1-1	0,2-0,9	0,2-0,9	0,2-0,9	0-1	0-2,8
<b>Kontrollgruppe</b>								
tcu-PA (ng/ml)	0-0,7	0-0,6	0-0,7	0-0,7	0,2-0,8	0,1-0,8	0-0,8	0-2
<b>PG Gruppe</b>								

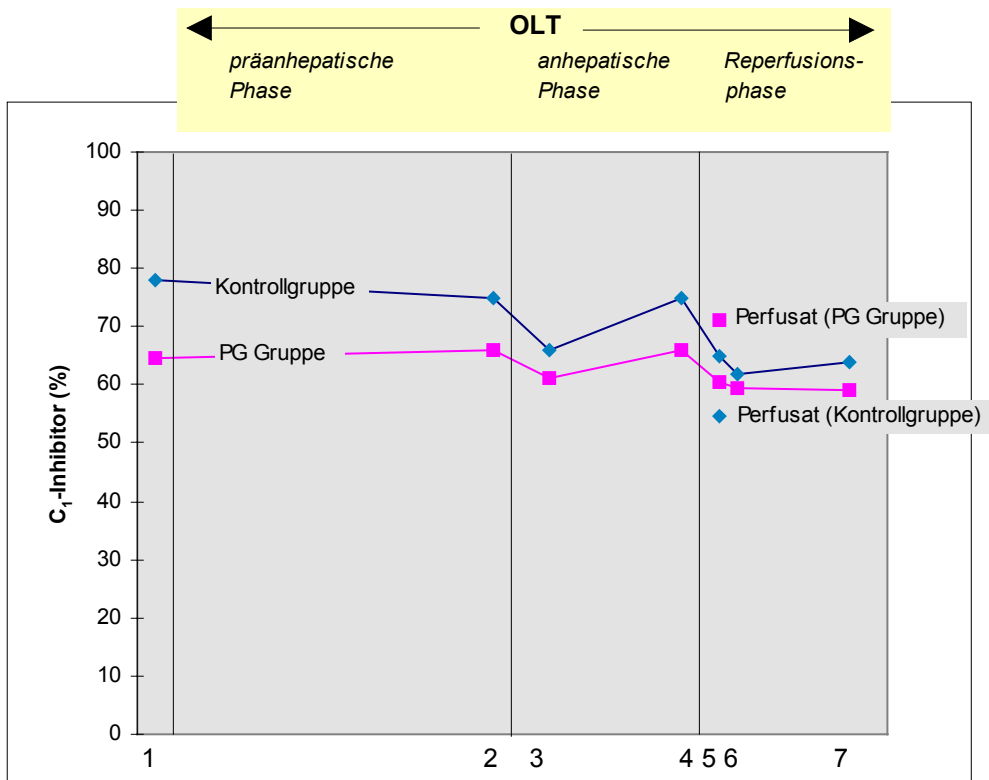
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
<b>Kontrollgruppe</b>	p(2/3)=0.0072	p(3/4)=0.0260	p(4/5)=0.0008	p(5/6)=0.0192
<b>PG Gruppe</b>	p(1/2)=0.0277		p(4/P)=0.0280	p(5/6)=0.0280



**Abbildung 96:** Aktivität von  $\alpha_2$ -Antiplasmin während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind in der Abbildung angegeben.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
$\alpha_2$ -Antiplasmin (%)	23-123	43-122	40-118	76-131	67-113	68-118	76-129	50-97
<b>Kontrollgruppe</b>								
$\alpha_2$ -Antiplasmin (%)	17-72	41-87	39-80	49-117	46-106	47-103	59-112	30-111
<b>PG Gruppe</b>								

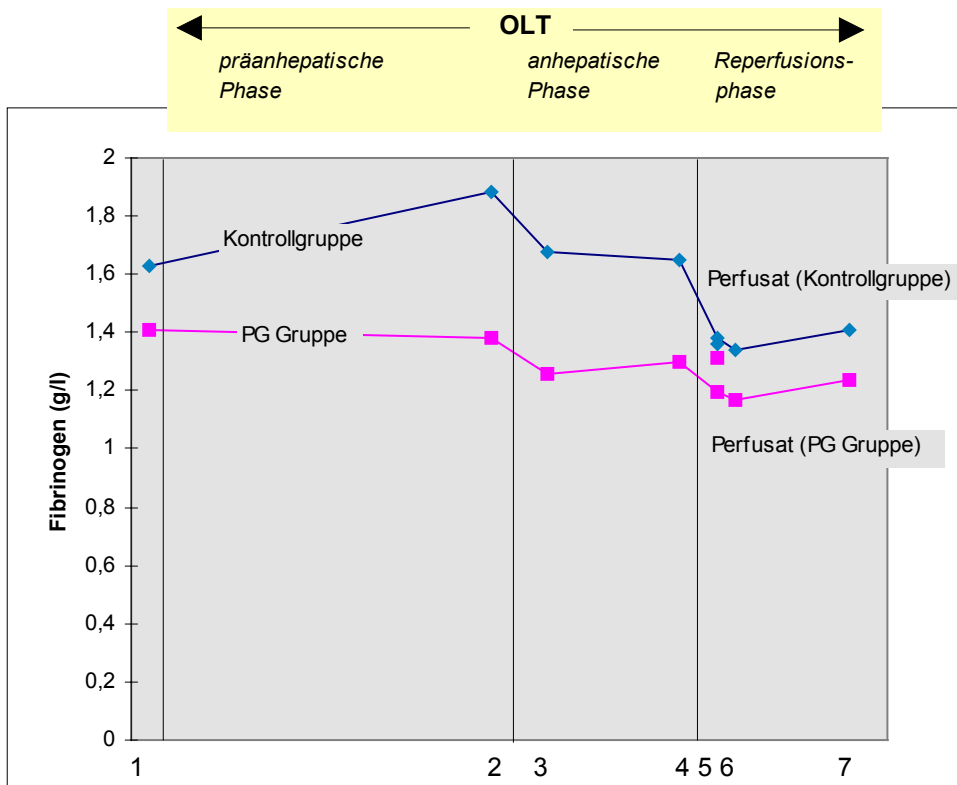
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
<b>Kontrollgruppe</b>	p(1/2)=0.0071	p(3/4)=0.0015	p(4/5)=0.0015	p(4/P)=0.0022
<b>PG Gruppe</b>	p(1/2)=0.0180	p(3/4)=0.0117	p(4/5)=0.0173	



**Abbildung 97:** C<sub>1</sub>-Inhibitor Aktivität während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
C <sub>1</sub> -Inhibitor (%) <b>Kontrollgruppe</b>	48-145	61-124	52-113	50-105	40-84	37-79	39-79	43-85
C <sub>1</sub> -Inhibitor (%) <b>PG Gruppe</b>	58-125	58-132	52-106	52-110	48-94	46-87	41-80	37-117

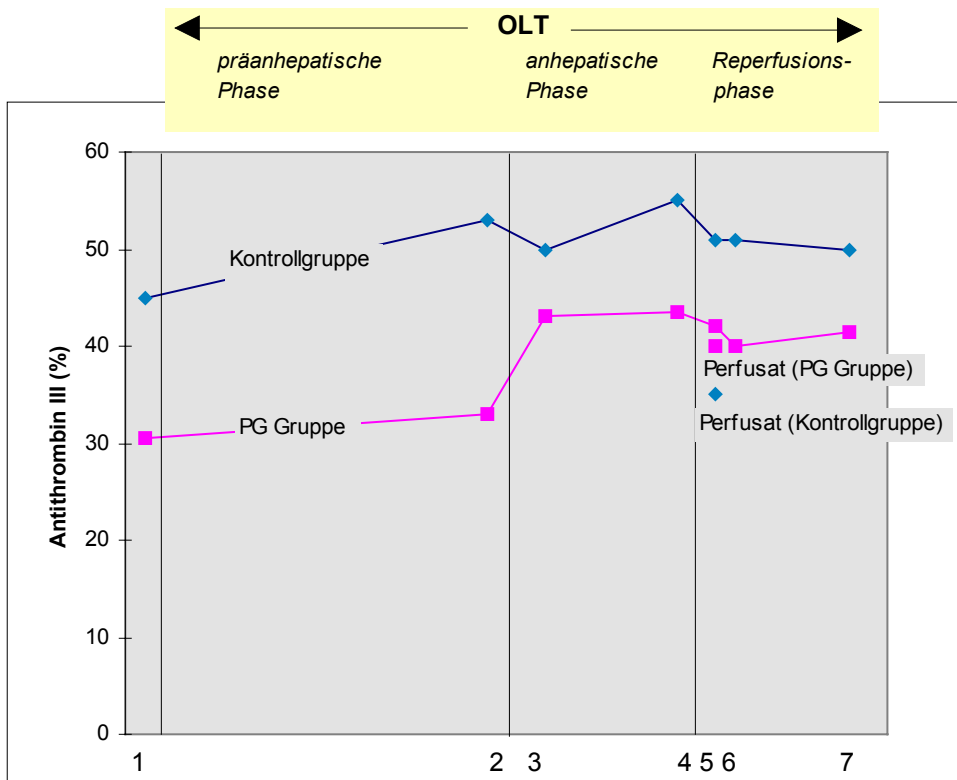
Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf				
<b>Kontrollgruppe</b>	p(2/3)=0.0150	p(4/5)=0.0037	p(5/6)=0.0033	p(4/P) =0.0037
<b>PG Gruppe</b>	p(2/3)=0.0180	p(4/5)=0.0251		



**Abbildung 98:** Fibrinogenkonzentration während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
Fibrinogen (g/l)	0,6-4,7	0,87-3,6	0,69-3,4	0,94-3,08	0,65-2,17	0,67-1,98	0,3-2,35	0,3-2,12
<b>Kontrollgruppe</b>								
Fibrinogen (g/l)	0,3-1,75	0,3-1,88	0,3-1,68	0,3-1,91	0,68-1,75	0,64-1,66	0,3-1,95	0,3-2,11
<b>PG Gruppe</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
<b>Kontrollgruppe</b>	p(2/3)=0.0008	p(4/5)=0.0030	p(5/6)=0.0099
<b>PG Gruppe</b>	p(2/3) =0.0431		p(4/P)=0.0150

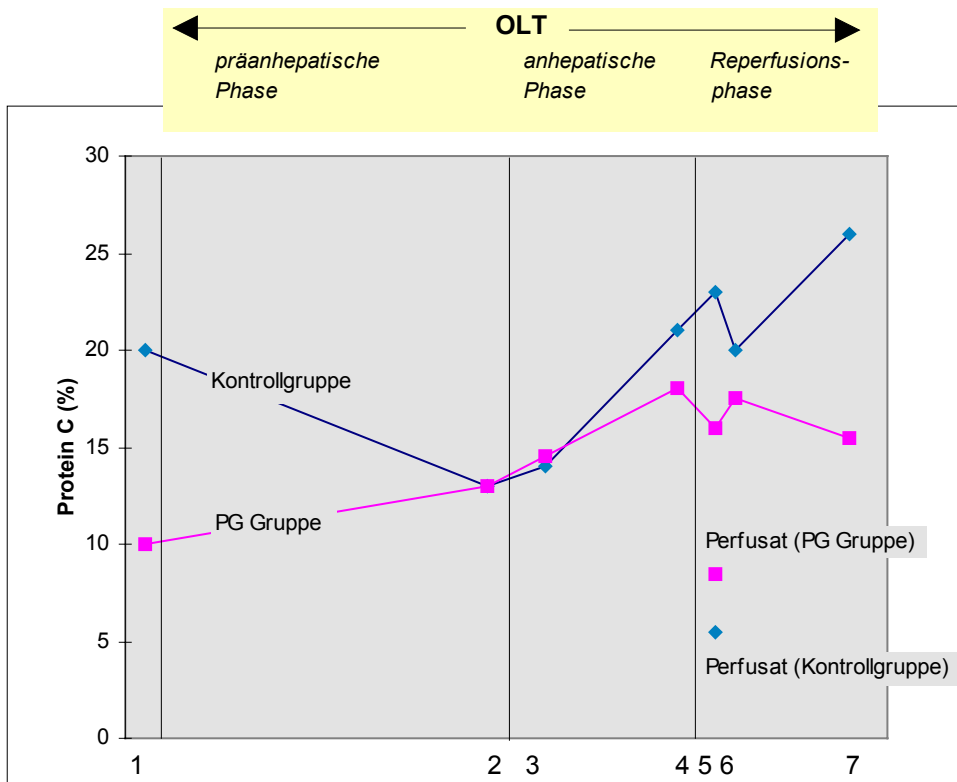


**Abbildung 99:** Antithrombin III Aktivität (AT III) während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
AT III (%)	16-123	22-103	23-103	30-100	35-109	30-76	36-79	17-55
<b>Kontrollgruppe</b>								
AT III (%)	11-80	13-88	9-90	16-101	15-87	14-91	16-119	15-96
<b>PG Gruppe</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf			
<b>Kontrollgruppe</b>	p(5/6)=0.0042	p(6/7)=0.0277	p(4/P)=0.0022
<b>PG Gruppe</b>			p(4/P)=0.0180

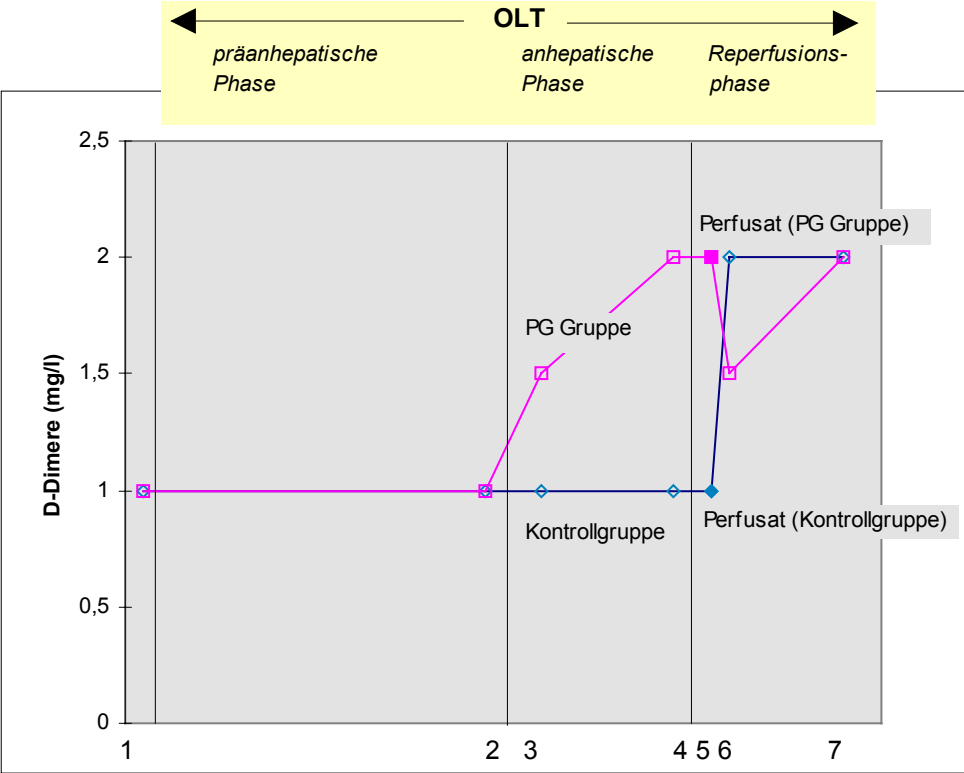




**Abbildung 100:** Protein C Aktivität während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

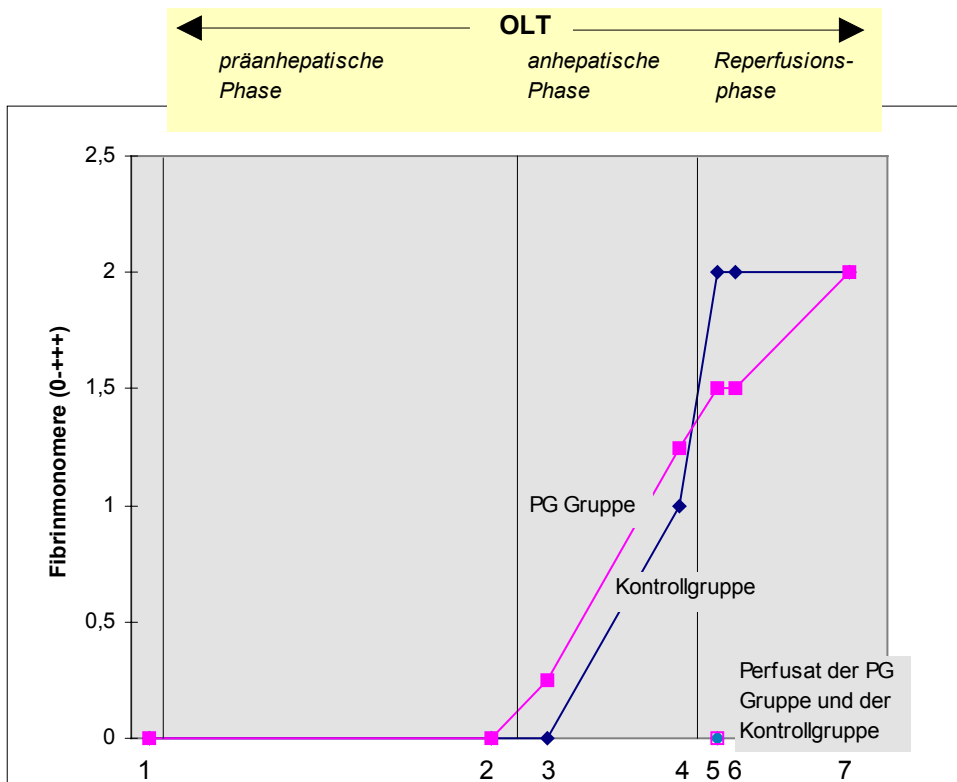
Spannweiten								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
Protein C (%)	2,5-110	2,5-70	2,5-62	5-79	6-65	6-55	9-51	2,5-22
<b>Kontrollgruppe</b>								
Protein C (%)	2,5-31	2,5-33	2,5-33	5-36	6-36	8-37	12-42	2,5-29
<b>PG Gruppe</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf		
<b>Kontrollgruppe</b>	p(3/4)=0.0499	p(4/P)=0.0022
<b>PG Gruppe</b>	p(3/4)=0.0180	p(4/P)=0.0117



**Abbildung 101:** Konzentration der D-Dimere während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweite								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
D-Dimere (mg/l)	0,5-8	0,5-4	0,5-2	0,5-2	0,5-4	0,5-4	0,5-8	1-16
<b>Kontrollgruppe</b>								
D-Dimere (mg/l)	0,25-8	0,25-8	0,5-4	1-4	0,5-4	0,5-4	1-8	1-8
<b>PG Gruppe</b>								



**Abbildung 102:** Konzentration der Fibrinmonomere während orthotoper Lebertransplantation und im Perfusat (P) bei 10 Patienten mit intraoperativer Prostaglandin E<sub>1</sub> Infusion (PG Gruppe) und bei 10 Kontrollpatienten ohne Prostaglandin E<sub>1</sub> Therapie (Kontrollgruppe). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Spannweite								
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	P
Fibrinmonomere (0-+++)	0-0	0-1	0-2	0-3	1-3	1-3	1-3	0-3
<b>Kontrollgruppe</b>								
Fibrinmonomere (0-+++)	0-1	0-2	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3	0-2
<b>PG Gruppe</b>								

Statistische Signifikanzen im einzelnen Kurvenverlauf	
<b>Kontrollgruppe</b>	p(4/5)=0.0423
<b>PG Gruppe</b>	

nach Reperfusion waren die  $\alpha_2$ -Antiplasminspiegel bei der Kontrollgruppe höher als bei der PG Gruppe. Die  $C_1$ -Inhibitoraktivität (Abb.97) zeigte bei beiden Gruppen Abfälle mit beginnender anhepatischer Phase und mit Reperfusion. Die Fibrinogenspiegel (Abb.98) fielen mit beginnender anhepatischer Phase bei beiden Gruppen und nach Reperfusion nur bei der Kontrollgruppe ab. Die AT III Aktivität (Abb.99) fiel nach Reperfusion bei der Kontrollgruppe signifikant ab während keine Veränderungen bei der PG Gruppe zu sehen waren. Die Protein C Aktivität (Abb.100) stieg bei beiden Gruppen in der anhepatischen Phase an. Die D-Dimerspiegel (Abb.101) veränderten sich bei beiden Gruppen nicht signifikant. Die Fibrinmonomere (Abb.102) stiegen nur bei der Kontrollgruppe mit beginnender Reperfusion signifikant an.

Desweiteren wurden Spiegel in Perfusat und korrespondierender systemischer Zirkulation verglichen. Bei der Kontrollgruppe lagen die t-PA Aktivitätswerte im Perfusat höher (Abb.90) und die  $\alpha_2$ -Antiplasmin- (Abb.96),  $C_1$ -Inhibitor- (Abb.97), Fibrinogen- (Abb.98), AT III (Abb.102) und Protein C Werte (Abb.100) niedriger im Perfusat als in der systemischen Zirkulation.

Bei der PG Gruppe lagen die u-PA Ag- (Abb.93) und tcu-PA-Werte (Abb.95) im Perfusat höher während die Protein C (Abb.100) und AT III (Abb.99) Werte niedriger gemessen wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht.

### 6.3.2.3. Diskussion

Die Untersuchungen konnten zeigen, daß die intraoperative PGE<sub>1</sub> Infusion zu höheren t-PA Aktivitätswerten während der anhepatischen Phase und zu niedrigeren  $\alpha_2$ -Antiplasminspiegeln am Ende der anhepatischen Phase und kurz nach Reperfusion führte. Im Perfusat lagen im Vergleich zur systemischen Zirkulation bei PGE<sub>1</sub>-Gabe niedrigere t-PA Aktivitätswerte und höhere PAI und  $\alpha_2$ -Antiplasminspiegel vor - ein Unterschied, der bei der Kontrollgruppe nicht nachweisbar war. Der Effekt kann durch einen lokalen Hemmechanismus des PGE<sub>1</sub> auf die endotheliale t-PA Freisetzung in der Spenderleber zurückzuführen sein. Ein ähnlicher Effekt wurde mit der Fähigkeit des PGE<sub>1</sub>, die intrazellulären Spiegel von cAMP zu heben, erklärt (90). Im Gegensatz zu t-PA lagen bei der PG Gruppe die Konzentrationen von u-PA Ag und tcu-PA im Perfusat höher.

Nach Reperfusion fielen t-PA Aktivität und u-PA Parameter ab. Bei der Kontrollgruppe kam es zu diesem Abfall unmittelbar nach Reperfusion während er bei der PG Gruppe 15 Minuten (t-PA, tcu-PA) bzw. 60 Minuten (u-PA Ag) verzögert war oder bei scu-PA sogar fehlte. Im Falle der scu-PA, tcu-PA und u-PA Ag Werte ist dieses erklärbar durch höhere Perfusatspiegel, die einen schnellen postreperfusionellen Abfall verhindern. Der verspätete t-PA Aktivitätsabfall bei der PG Gruppe bleibt ohne Erklärung.

Beim plasmatischen Gerinnungssystem konnte bei beiden Gruppen im Perfusat ein Inhibitorverbrauch (Protein C, AT III) wie vorbeschrieben (Kapitel 4; 116,117) gemessen werden. Dieser fehlte in der systemischen Zirkulation der PG Gruppe. Darüberhinaus konnte nur bei der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der Fibrinmonomere im Sinne einer verstärkten Gerinnungsaktivierung gesehen werden. Die Anwesenheit von PGE<sub>1</sub> scheint zur Verminderung der postreperfusionellen Gerinnungsaktivierung zu führen.

Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen müssen klären, ob und in welchem Ausmaß sich die laborparametrischen Veränderungen klinisch auswirken.

## 7. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK (ABB.99)

Während der OLT werden vorbestehende Hämostasedefekte bei Hepatopathie durch unterschiedliche Störmechanismen über das durch „vergleichbare“ Operationen bekannte Maß hinaus weiter verstärkt. In der anhepatischen Phase konnte eine gesteigerte Aktivität der fibrinolytischen Aktivität (123,128) gemessen werden. Diese scheint zunächst lokalisiert das extrinsische fibrinolytische System zu betreffen, das durch einen Triggermechanismus sekundär zur Aktivierung des intrinsischen fibrinolytischen Systems führt. Es ist anzunehmen, daß die Aktivierungsmechanismen durch Kontaktaktivierung beim Passieren des Blutes durch den veno-venösen Bypass analog zu den Ergebnissen bei kardiopulmonalen Bypassen (189, 341) verstärkt werden. Es scheint daher wahrscheinlich, daß für die bei OLT regelmäßig zu beobachtende Hyperfibrinolyse in der anhepatischen Phase eine überschießende Aktivierung des intrinsischen Fibrinolysesystems wesentlich ist, t-PA hingegen nur eine initiale Auslöserfunktion zukommt.

Die Entwicklung einer chromogenen Substratmethode zur Bestimmung der Aktivität des F XII-abhängigen Plasminogenaktivators (i-PA) (118) ermöglichte es, diesen neben u-PA bedeutsamsten intrinsischen Plasminogenaktivator im Verlauf von 47 OLTs zu bestimmen. Der hochsignifikante Anstieg der i-PA Aktivität in der anhepatischen Phase in Gegenwart von Aprotinin, das die i-PA Aktivität, Plasmin und die Kontaktphasefaktoren zu hemmen vermag, suggeriert, daß es in Abwesenheit von Aprotinin zu einem weitaus deutlicheren Anstieg der i-PA Aktivität kommt (118). Parallel konnte auch ein signifikanter Anstieg der u-PA Aktivität gemessen werden (129,134,138). Die Ergebnisse belegen somit die Bedeutung des intrinsischen fibrinolytischen Systems für die Entwicklung der gesteigerten Fibrinolyse während der anhepatischen Phase.

In der Reperfusionsphase (Abb.99) konnten laborchemisch Zeichen einer gesteigerten Prothrombinaktivierung mit Absinken der Gerinnungsinhibitoren gemessen werden (128,135,140), sodaß DIC-artige Hämostaseveränderungen (136) für die postreperfusionellen Blutverluste verantwortlich gemacht werden (119,120). Es ist von einer primären DIC auszugehen, da keine Korrelation zur anhepatischen Fibrinolyse nachgewiesen werden konnte. Die Rolle der Spenderleber in der Pathogenese dieser gesteigerten Gerinnungsaktivierung wurde deutlich durch Untersuchungen des Perfusats, das entsprechende DIC-artige Hämostaseveränderungen zeigte. Darüberhinaus deuteten stark ansteigende Werte leukozytärer Aktivierungsprodukte wie extrazelluläre Proteinasen (Kathepsin B, Elastase, Neopterin) (141) und Zytokine (TNF, IL-6, IL-8) (142) in der frühen Reperfusionsphase und erhöhte Spiegel im Perfusat auf eine intravasale Freisetzung von intrazellulären Enzymen des Granulozyten- und Monozyten/Makrophagensystems in der Spenderleber hin (141). Erhöhte sThrombomodulinwerte systemisch und im Perfusat sprechen für eine gleichzeitig vorliegende Endothelschädigung in der Spenderleber. Tierexperimentell konnte in Lebertransplantaten nach Reperfusion eine verstärkte Adhäsion von Lymphozyten (50) und Leukozyten (320) gezeigt werden. Es ist vorstellbar, daß Endothelschäden und intrazelluläre Freisetzungsprodukte aus Leukozyten und aus ischämisch geschädigten Hepatozyten und RES Zellen der Leber die plasmatische Gerinnung aktivieren. Parallel zu diesen Störungen kommt es nach Reperfusion zu einer Verminderung der Thrombozytenzahl und ihrer Aggregabilität. Diese scheint partiell durch die aggregationshemmende Wirkung der UW-Konservierungslösung bedingt zu sein (121,122).

## Pathophysiologie der Hämostasestörungen während orthotoper Lebertransplantation

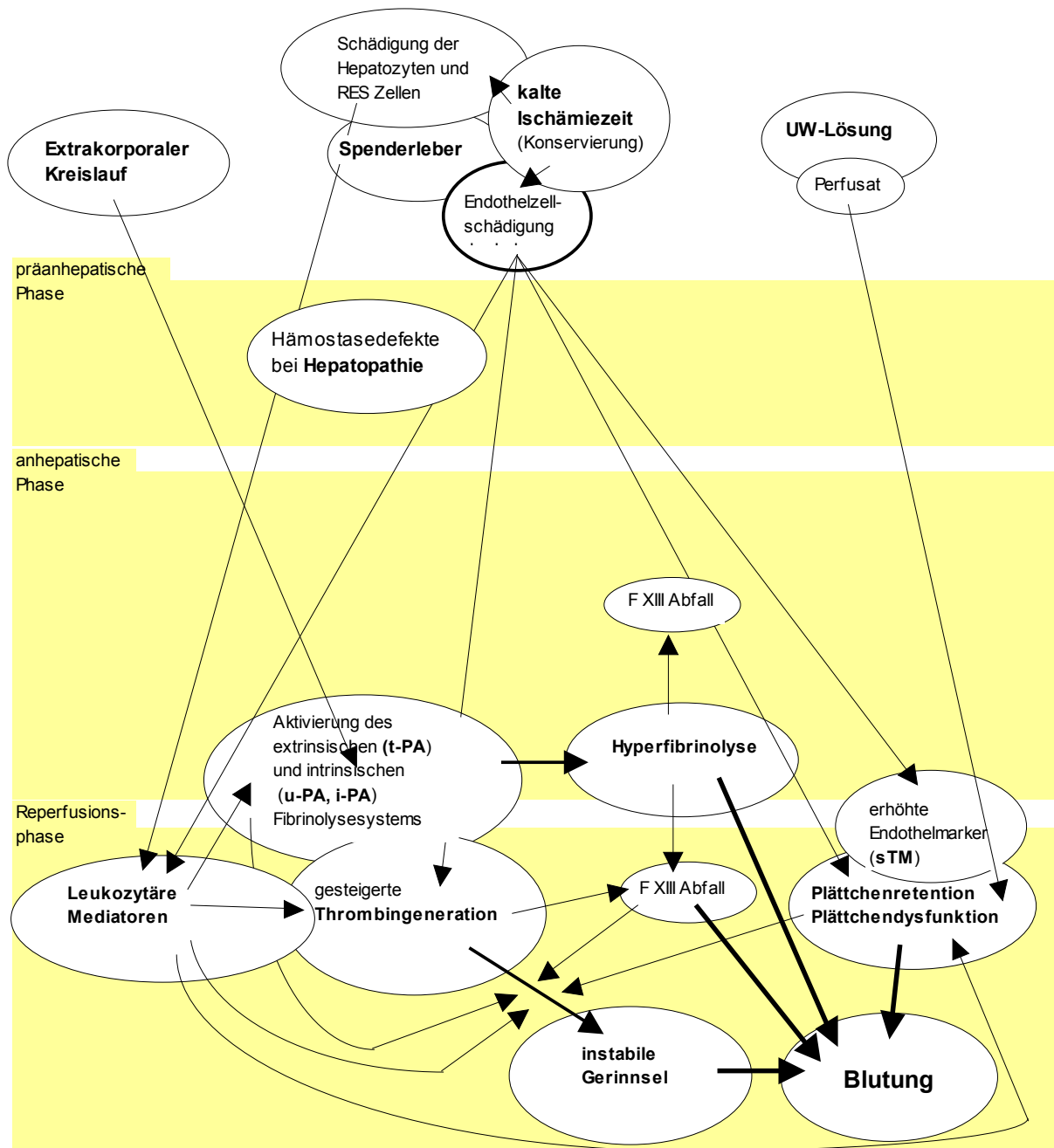


Abbildung 103:

Darüberhinaus spielen auch hier Aktivitätsmechanismen der Thrombozyten am - in der kalten Ischämiezeit geschädigten - Spenderorgan eine Rolle (125,132). Es ist anzunehmen, daß leukozytäre Aktivierungsprodukte wie z.B. Elastase und TNF eine Schlüsselrolle einnehmen, da sie zum einen in der Lage sind, Endothelzellen zu schädigen (353) bzw. in ihrer Funktionalität zu verändern. So ist für die Zytokine IL-1 und TNF beschrieben, daß sie am Endothel eine gesteigerte de-novo Synthese des leukozytären Adhäsionsmoleküls L-Selectin und eine Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) bewirken (268). Beides hat eine verstärkte Bindung und transendotheliale Migration der Leukozyten in vitro zur Folge (61,217,269,303). Die vorliegenden Untersuchungen zeigten einen signifikanten Abfall der löslichen Adhäsionsproteine sL-Selectin und sICAM-1 mit beginnender Reperfusion (142). Leukozytäre Aktivierungsprodukte haben darüber hinaus die Fähigkeit, die thrombozytäre Aggregationsfähigkeit herabzusetzen (34,254), AT III abzubauen (91) und durch verstärkte endotheliale t-PA und PAI Freisetzung das fibrinolytische System zu beeinflussen (300).

Der Proteaseninhibitor Aprotinin scheint Hyperfibrinolysezeichen, maximalen Anstieg der t-PA Aktivität, Transfusionsbedarf und endotheliale Schäden in der Spenderleber zu reduzieren, wobei in einer klinischen Studie der Vorteil einer kontinuierlichen Infusionsgabe gegenüber einer dreimaligen Bolusgabe bezüglich Laborparametern deutlich wurde (126,127,137). Bei höheren systemischen Aprotininspiegeln durch kontinuierliche Infusion konnte parallel laborchemisch eine verstärkte Prothrombinaktivierung nachgewiesen werden. Es kam jedoch weder zu einem verstärkten Inhibitorverbrauch noch zu thromboembolischen Komplikationen.

In einer weiteren Therapiestudie wurde versucht durch intraoperative PGE<sub>1</sub>-Gabe endotheliale Aktivierungsprozesse in der Spenderleber zu beeinflussen. Tatsächlich führte eine PGE<sub>1</sub>-Infusion, gegeben in einer offenen, randomisierten Studie, zu einem signifikant schwächeren postreperfusionellen Abfall sowohl der Thrombozytenzahl als auch der thrombozytären Aggregationsfähigkeit (130,133). Da PGE<sub>1</sub> die Adhäsion der Leukozyten (160) und die lysosomale Freisetzung von Neutrophilen (84) herabsetzt, ist auch an eine Wirksamkeit auf diesem Wege zu denken neben einer primär direkten Verminderung der thrombozytären Aggregationsantwort. PGE<sub>1</sub> Gabe führte darüberhinaus zur erhöhten t-PA Aktivität in der anhepatischen und zur geringeren Prothrombinaktivierung in der Reperfusionsphase. Klinische Relevanz zeigte sich jedoch nicht.

Auf den ersten Blick unverständlich bleibt die Genese diffuser Blutungen im Operationsgebiet nach Reperfusion trotz laborchemisch abnehmender Fibrinolyseaktivität und vermehrter intravasaler Thrombingeneration. Neben der Thrombozytopenie und -pathie ist eine verminderte Stabilität hämostatischer Gerinnsel anzunehmen, die bei gesteigerter Fibrinolyseaktivität und verminderter F XIII Aktivität (131) während der anhepatischen Phase gebildet werden. Bei in der Regel guter Clearance- und überraschend rasch nachweisbarer Synthesefunktion der Transplantatleber kann trotz Abnahme der systemisch gemessenen t-PA und u-PA Aktivitäten eine lokal gesteigerte, reaktive Plasminbildung zur Lyse dieser frischen und instabilen Gerinnsel führen.

Bei der Gesamtbeurteilung der vorliegenden Daten spiegeln systemisch gemessene Laborparameterkonstellationen und systemisch benötigte Blutprodukte nur summativ das lokale Geschehen wider. Für die klinische Situation des Patienten ist jedoch die Vielzahl der lokalen Geschehnisse bedeutsam. So ist das beobachtete „Oozing“ im Operationsgebiet ein

für den Patienten wichtiges lokales aber kein systemisches Phänomen. Darüberhinaus beeinflussen auch vaskuläre Faktoren wie Vasomotorenstatus, Temperatur, Blutdruck u.a. die Hämostase während OLT.

Ein zukünftiges Therapiekonzept könnte die therapeutische Beeinflussung der gesteigerten leukozytären Aktivierung z.B. durch Blockade der endothelialen Adhäsionsmoleküle (68,144) oder den Einsatz von Cyclosporin, einem Inhibitor der Zytokininfreisetzung, beinhalten. Letzteres hatte in OLTs bei Schweinen zu einer Verbesserung der postreperfusionellen Hämostaseveränderungen geführt (174). Die in mehreren Studien gezeigten DIC-artigen Veränderungen nach Perfusion der Spenderleber lassen eine präventive, d.h. präreperfusionelle, AT III-Gabe sinnvoll erscheinen. Palareti et al. (263) gaben bei 20 Patienten mit Leberzirrhose vor und während der OLT AT III Konzentrate. Dieses führte zu einer Verbesserung der plasmatischen Gerinnung und zu einer Verminderung der Fibrinolysezeichen. Baudo et al. (16) zeigten jedoch in einer randomisierten Studie, in die 29 Patienten mit OLT eingeschlossen waren, daß sich der Transfusionsbedarf in der Gruppe mit AT III Substitution (n=13) nicht von der Kontrollgruppe (n=16) unterschied.

Neueste Untersuchungen (297) sprechen für eine Sonderrolle der primären biliären Zirrhose bei OLT. Hier scheint die Thrombinentwicklung gesteigert und die Fibrinolysekapazität geringer als in OLTs bei anderen Lebererkrankungen zu sein, sodaß hier der Nutzen einer antifibrinolytischen Therapie eventuell gesondert untersucht werden muß.

Es bedarf großer, multizentrischer Studien, um die klinische Relevanz der beschriebenen, ineinandergreifenden pathophysiologischen Prozesse und deren mögliche therapeutische Beeinflussung noch besser beurteilen zu können, so wie dies durch die bereits erwähnte EMSALT Studie (276, 6.2.3.) erstmalig und bisher einmalig geschehen ist.



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Marino M, Astarcioglu I, Johann M, Azoulay D, Chiche L, Bao YM, Catstaing D. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet* 1992; 340: 1373-1376.
2. Andus T, Heinrich PC, Castell JC, Gerok W. Interleukin-6: ein Schlüsselhormon der Akutphase-Reaktion. *Dtsch med Wschr* 1989; 114: 1710-1716.
3. Aoki N, Yamanaka T. The  $\alpha_2$ -antiplasmin inhibitor levels in liver diseases. *Clin Chim Acta* 1978; 84: 99-105.
4. Allen RD, Zacharski LR, Widirsky ST. Transformation and motility of human platelets. Details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *J Cell Biol* 1979; 83: 126-142.
5. Araki H, Lefer AM. Cytoprotective effect of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Fed Proc* 1980; 84: 99-105.
6. Assfalg-Machleidt I, Jochum M, Nast-Kolb D, Siebeck M, Billing A, Joka T, Rothe G, Valet G, Zauner R, Scheuber HP, Machleidt W. Cathepsin B - indicator for the release of lysosomal cysteine proteinases in severe trauma and inflammation. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990; 371: 211-222.
7. Astedt B, Lescander I, Ny T. The placental type plasminogen activator inhibitor, PAI-2. *Fibrino Thrombol Blood Clott* 1987; 1: 203-207.
8. Astrup T. The biological significance of fibrinolysis. *Lancet* 1956; ii: 565-568.
9. Astrup T, Jespersen J. Thrombosis, disseminated intravascular coagulation and the dynamic haemostatic balance. Aspects of prophylaxis and treatment. *Int Angiol* 1984; 3: 331-332.
10. Bachmann F. Fibrinolysis. In: Verstraet M, Vermynen J, Lijnen HR, Arnout J (eds.). *Thrombosis and haemostasis* 1987. Leuven: Leuven University Press, 1987: 227-265.
11. Bakker CM, Knot EAR, Stibbe J, Wilson JHP. Disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1992; 15: 330-335.
12. Bakker CM, Metselaar HJ, Groenland TN, Gomes MJ, Knot EAR, Hesselink EJ, Schalm SW, Stibbe J, Terpestra OT. Increased tissue-type plasminogen activator activity in orthotopic but not in heterotopic liver transplantation: the role of the anhepatic period. *Hepatology* 1992; 16: 404-408.
13. Bakker CM, Metselaar HJ, Gomes MJ, Porte RJ, Groenland TN, Schalm SW, Terpstra OT, Stibbe J. Intravascular coagulation in liver transplantation. Is it present or not? *Thromb Haemostas* 1993; 69: 25-28.

14. Ballard HH, Marcus AJ. Platelet aggregation in portal cirrhosis. *Arch Intern Med* 1976; 136: 316-319.
15. Barroso Garcia de Silvia E, Gore SM, White DJG, Bourgeon JA, Rolles K, Calne RY. An analysis of risk factors in liver transplantation. *Transplant Proc* 1986; 18: 1210-1212.
16. Baudo F, DeGasperi A, Redaelli R, Caimi T, Cattaneo D, Mazza E, Corti A, Belli L, de Cataldo F. AT III replacement therapy in cirrhotic patients undergoing liver transplantation: a randomized study. *Thromb Haemostas* 1991; 65: 1091 (Abstrakt).
17. Bechstein WO, Riess H, Neuhaus P, Himmelreich G, Steffen R, Slama KJ, Rossaint R, Blumhardt G. The effect of aprotinin on blood product requirements during orthotopic liver transplantation. *Clin Transplant* 1991; 5: 422-426.
18. Bergström S, Ryhage R, Samuelsson B, Sjövall J. Prostaglandins and related factors. The structures of prostaglandin and E1, F1a, and F1b. *J Biol Chem* 1963; 238: 2355-2368.
19. Bidstrup BP, Harrison J, Royston D, Taylor KM, Treasure T. Aprotinin therapy in cardiac operations: a report on use in 41 cardiac centers in the United Kingdom. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 971-976.
20. Biland L, Duckert F, Priesender S, Nyman D. Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease: The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V, and plasminogen. *Thromb Haemost* 1979; 39: 646-653.
21. Binnema DJ, Dooijewaard G, van Iersel JJJ, Turion PNC, Kluft C. The contact-system dependent plasminogen activator from human plasma: identification and characterization. *Thromb Haemostas* 1990; 64: 390-397.
22. Binnema DJ, van Iersel JJJ, Dooijewaard G. Quantitation of urokinase antigen in plasma and culture media by use of an ELISA. *Throm Res* 1986; 43: 569-577.
23. Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, Rolles K, Ringe B, Sloof M. Hepatic transplantation in Europe. First report of the European Liver Transplant Registry. *Lancet* 1987; ii: 674-676.
24. Blecher TE, Terblanche J, Peacock JH. Orthotopic liver transplantation. Coagulation and hematologic changes in the pig. *Arch Surg* 1968; 96: 331-339.
25. Bloom AL. Intravascular coagulation and the liver. *Br J Haematol* 1975; 30: 1-7.
26. Böhmig HJ, Fritsch A, Kux M, Lechner G, Lechner K, Reich N, Stockinger L, Zeitelberger P. Gerinnungsveränderungen bei orthotoper Lebertransplantation am Hund. *Thromb Diath Haemorrh* 1969; 21: 332-345.

27. Böhmig HJ. The coagulation disorder of orthotopic hepatic transplantation. *Semin Thromb Hemostasis* 1977; 4: 57-82.
28. Boks AL, Brommer EJP, Schalm SW, van Vliet HHDM. Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage. *Hepatology* 1986; 6: 79-86.
29. Bontempo FA, Lewis JH, van Thiel DH, Spero JA, Ragni MV, Butler P, Israel L, Starzl TE. The relation of preoperative coagulation findings to diagnosis, blood usage, and survival in adult liver transplantation. *Transplantation* 1985; 39: 532-536.
30. Booth NA, Anderson JA, Bennett B. Plasminogen activator in alcoholic liver cirrhosis: demonstration of increased tissue type and urokinase type activator. *J Clin Pathol* 1984; 37: 772-777.
31. Booth NA, Walker E, Maughan R, Bennett B. Plasminogen activator in normal subjects after exercise and venous occlusion: t-PA circulates as complexes with C1-inhibitor and PAI-1. *Blood* 1987; 69: 1600-1604.
32. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168: 178-195.
33. Boylan JF, Klinck JR, Sandler AN, Arellano R, Greig PD, Nierenberg H, Roger SL, Glynn MF. Tranexamic acid reduces blood loss, transfusion requirements, and coagulation factor use in primary orthotopic liver transplantation. *Anesthesiology* 1996; 85: 1043-1048.
34. Brower MS, Levin RI, Garry K. Human neutrophil elastase modulates platelet function by limited proteolysis of membrane glycoproteins. *J Clin Invest* 1985; 75: 657-666.
35. Brozovic M. Acquired disorders of coagulation. I: Bloom AL, Thomas DP (eds.). *Haemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Curchill Livingstone, 1987: 542-553.
36. Bykowska K, Levin EG, Rijken DC, Loskutoff DJ, Collen D. Characterization of a plasminogen activator secreted by cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1982; 703: 113-115.
37. Bykowska K, Pawlowka Z, Cierniowski C, Lopaciuk S, Kopec M. Different effects of human neutrophil elastase on platelet glycoproteins IIb and IIIa of resting and stimulated platelets. *Thromb Haemostas* 1990; 64: 69-73.
38. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat liver. *Hepatology* 1989; 10: 292-299.
39. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial damage after storage of rat livers in Euro-Collins and UW cold storage solutions: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13: 83-95.

40. Camussi G, Bussolino F, Salvidio G, Baglioni C. Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear leukocytes and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* 1987; 166: 1390-1404.
41. Canales J, Gove CD, Gimson AES, Wilkinson SP, Wardle EN, Williams R. Reticuloendothelial system and hepatocyte function in fulminant hepatic failure. *Gut* 1982; 23: 265-269.
42. Carlson LA, Irion E, Orö L. Effect of infusion of prostaglandin E1 on the aggregation of blood platelets in man. *Life Sci* 1968; 7(1): 85-90.
43. Castellino EJ. Biochemistry of human plasminogen. *Semin Thromb Haemost* 1984; 10: 18-23.
44. Cauchie P, Pradier O, Dejonckheere M, Gelin M, Wijns W, Capel P. DIC, Fibrinolysis and aprotinin treatment during orthotopic liver transplantation (OLT). *Thromb Haemostas* 1991; 65: 1089 (Abstrakt).
45. Cazenave J-P, Gucciono MA, Packham MA, Mustard JF. Effects of cephalothin and penicillin G on platelet function in vitro. *Brit J Haematol* 1977; 35: 135-152.
46. Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 1977; 60: 866-873.
47. Chmielewska J, Ranby M, Wiman B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res* 1983; 31: 427-436.
48. Claeys H, Vermeylen J. Purification and characterization of human plasminogen. Physicochemical and proenzyme properties of amine terminal glutamic acid and amino terminal lysine plasminogen. Influence of 6-amino hexanoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1974; 342: 351-359.
49. Clasen C, Jochum M, Mueller-Esterl W. Feasibility study of very high aprotinin dosage in polytrauma patients. In: First Vienna Shock Forum, Part A: Pathophysiological role of mediators and mediator inhibitors in shock. Alan R. Liss. Inc. 1987: 175-183.
50. Clavien P-A, Morgan GR, Sanabria JR, Petruschka C, Levy GA, Robert P, Harvey C, Strasberg SM. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation* 1991; 52: 412-417.
51. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med* 1986; 414: 1298-1304.
52. Col-De Beys C, Carlier M, Reynaert M, Lavenne-Pardonge E, Legrand-Monsieur A, Otte J-B, Moriau M. Prediction of bleeding during orthotopic liver transplantation in recipients given tranexamic acid. *Thromb Haemostas* 1991; 65: 1088 (Abstrakt).

53. Collburn P, Buonassisi V. Anti-clotting activity of endothelial cell and heparan sulfate proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 104: 220-227.
54. Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, Oldham KT, Campell DA. The production of tumor necrosis factor alpha and the developmemt of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 1990; 49: 268-272.
55. Collen D. Identification and some properties of a new fast reacting plasma inhibitor in human plasma. *Eur J Biochem* 1976; 69: 209-216.
56. Collen D, Rouvier J, Chamone DAF, Verstraete M. Turnover of radiolabelled plasminogen and prothrombin in cirrhosis of the liver. *Eur J Clin Invest* 1978; 8: 185-188.
57. Collen, D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Haemostas* 1980; 43: 77-89.
58. Colman RW. Activation of plasminogen by human plasma kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 35: 273-279.
59. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, Semerar N. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest* 1983; 71: 1893-1896.
60. Cosimi AB, Geoffrion C, Anderson T, Conti D, Rothlein R, Calvin RB. Immunosuppression of cynomolgus recipients of renal allograft by R66.5, a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1. In: Springer TA, Anderson DC, Rosenthal AS, Rothlein RR (eds.). *Leukocyte adhesion molecules*. New York: Springer, 1990: 274-278.
61. Cotram RS. New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 1987; 129: 407-413.
62. Corrigan JJ. Diagnosis and therapy of coagulopathies in patients with liver disease. In: Brown R (ed.). *Anesthesia and the patients with liver disease*. Contemporary Anesthesia Practice 4. PA: Davis Comp 1981: 1-11.
63. Cossel L. Electron microscopy of thrombocytes in orthotopic porcine liver homograft during the late rejection (phagocytosis of thrombocytes by Kupffer cells). *Virchows Arch A Path Anat Histol* 1974; 364: 265-273.
64. Cottam S, Hunt B, Segal H, Ginsburg R, Potter D. Aprotinin inhibits tissue-plasminogen activator mediated fibrinolysis during orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 1933.
65. Cramer EM, Lu H, Caen JP, Soria C, Berndt MC, Tanla D. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa after plasmin stimulation. *Blood* 1991; 77: 694-699.

66. Crutchley DJ, Cananan LB, Maynard JR. Stimulation of fibrinolytic activity in human skin fibroblasts by prostaglandins E1, E2 and I2. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222: 544-549.
67. Currin DR, Pechet L. Discriminant analysis on coagulation and fibrinolytic data obtained during liver homotransplantation. *Thromb Diath Haemorrh* 1969; 22: 411-416.
68. Cywes R, Harvey PR, Packham MA, Cameron R, Strasberg SM. The influence of prostaglandin E1 on platelet adherence and injury in preserved rat liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1996; 2: 23-36.
69. Dahlback B, Stentlo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2512-2516.
70. Dahlback B. Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem J* 1983; 209: 847-856.
71. Deutsch E. Blood coagulation changes in liver diseases. In: Popper H, Schaffner F (eds.). *Progress in liver disease*, Vol. 2, New York, Grune and Stratton 1965: 69-83.
72. Dietrich W, Brankay A, Dilthey G, Henze R, Niekau E, Sebening F, Richter JA. Reduction of homologous blood requirement in cardiac surgery by intraoperative aprotinin application - clinical experience in 152 cardiac surgical patients. *Thorac cardiovasc Surgeon* 1989; 37: 92-98.
73. Application to liver transplantation. *Surgery* 1970; 68: 269-276.
74. Dittmann WA, Majerus PW. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* 1990; 75: 329-336.
75. Dooijewaard G, van Iersel JJL, Brommer EJP. Quantiation of pro-UK, UK, and UK-Inhibitor levels in plasma of patients and healthy men. *Fibrinolysis* 1987; 1 supp 1: 142 (Abstrakt).
76. Dooijewaard G, de Boer A, Turion PNC, Cohen AF, Breimer DD, Kluft C. Physical exercise induces enhancement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) levels in plasma. *Thromb Haemostas* 1991; 65: 82-86.
77. Dooijeward G, de Yong YF, Jie AFH, Kluft C. The role of kallikrein in the generation of the factor XII-dependent plasminogen activator activity in human plasma. *Thromb Haemost* 1985; 54: 268 (Abstakt).
78. Dzik WH, Arkin CF, Jenkins RL, Stump DC. Fibrinolysis during liver transplantation in humans. Role of tissue-type plasminogen activator. *Blood* 1988; 71: 1090-1095.
79. Edmunds LH, Niewarowski S, Colman RW. Invited letter concerning aprotinin. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101: 1103-1104.

80. Emeis JJ. Mechanisms involved in short-term changes in blood levels of t-PA. In: Kluft C (ed.). Tissue-type plasminogen activator (t-PA): physiological and clinical aspects. Boca Raton; CRC press 1988; II: 21-36.
81. Emmons PR, Hampton JR, Harrison MJG, Honour AJ, Mitchell JRA. Effect of prostaglandin E1 on platelet behaviour in vitro and in vivo. *Brit Med J* 1967; 2: 468-472.
82. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987; 235: 1348-1352.
83. Fair DS, Martar RA, Levin EG. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* 1986; 67: 1168-1171.
84. Fantone JC, Marasco WA, Elgas LJ, Ward PE. Stimulus specificity of prostaglandin inhibition of rabbit polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and superoxide anion production. *Am J Pathol* 1984; 115: 9-16.
85. Fickenscher K, Aab A, Stüber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 1991; 65: 535-540.
86. Finn A, Naik S, Klein N, Levinsky RJ, Strobel S, Elliott M. Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 234-241.
87. Flechter AP, Biederman O, Moore D, Alkjaersig N, Sherry S. Abnormal plasminogen-plasmin system activity (fibrinolysis) in patients with hepatic cirrhosis: Its cause and consequences. *J Clin Invest* 1964; 43: 681-695.
88. Fukami HM, Salganikoff HL. Human platelet storage organelles: A review. *Thromb Haemostasis* 1977; 38: 963-976.
89. Fraedrich G, Weber C, Bernard C, Hettwer A, Schlosser V. Reduction of blood transfusion requirement in open heart surgery by administration of high doses of aprotinin - preliminary results. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1989; 37: 89-91.
90. Francis RB Jr, Neely S. Inhibition of endothelial secretion of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor by agents which increase intracellular cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1012: 207-213.
91. Fritz H, Jochum M, Duswald KH, Dittmer H, Kortmann H, Neumann S, Lang H. Granulocyte proteinases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation: a review. In: *Selected Topics in Clinical Enzymology*, Vol.2, Goldberg DM, Werner M (eds.). Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1984: 306-328.
92. Fritz H, Wunderer G, Jochum M. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1983; 33: 479-494.

93. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dietrich MP, Wachter H. Neopterin in clinical medicine (letter). *Lancet* 1988; 1: 702.
94. Függer R, Hamilton G, Steiniger R, Mirza D, Schulz F, Mühlbacher F. Intraoperative estimation of endotoxin, TNF $\alpha$ , and IL-6 in orthotopic liver transplantation and their relation to rejection and postoperative infection. *Transplantation* 1991; 52: 302-306.
95. Fuhrer G, Heller W, Hoffmeister H-E. Das Verhalten von Plasma-Präkallikrein/-Kallikrein bei Patienten mit aorto-koronarer Bypass-Operation unter Anwendung zweier verschiedener Aprotinin-Dosierungsschemata. In: *Proteolyse und Proteinaseinhibition in der Herz- und Gefäßchirurgie*. Dudziak R, Kirchhoff PG, Reuter HD, Schumann F (eds.). Stuttgart: Schattauer Verlag 1985; 255-261.
96. Gaber AO, Thistlethwaite JR Jr, Busse-Henry S, Aboushlove M, Emond J, Rouch D, Broelsch CE. Improved results of preservation of hepatic grafts preflushed with albumin and prostaglandins. *Transplant Proc* 1988; 20: 992-993.
97. Gans H, Lowman JT. The uptake of fibrin and fibrin degradation products by isolated perfused rat liver. *Blood* 1967; 29: 526-539.
98. Garcia-Huete L, Domenech P, Sabate A, Martinez-Brotons F, Jaurrieta E, Figueras J. The prophylactic effect of aprotinin on intraoperative bleeding in liver transplantation: a randomized clinical study. *Hepatology* 1997; 26: 1143-1148
99. Geiger M. Protein C Inhibitor/Plasminogen activator inhibitor 3. *Fibrinolysis* 1988; 2: 183-188.
100. Goldsmith GH, Saito H, Ratnoff OD. The activation of plasminogen by Hageman factor (factor XII) and Hageman factor fragments. *J Clin Invest* 1978; 62: 54-60.
101. Goldsmith MF. Liver transplantation: big business in blood. *JAMA* 1983; 250: 2904-2905.
102. Gonias SL, Pizzo SV. The biochemistry of haemostasis. *Clin Lab Haemat* 1986; 8: 281-305.
103. Goodpasture EW. Fibrinolysis in chronic hepatic insufficiency. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1914; 25: 330-336.
104. van der Graaf F, Keus FIA, Vlooswijk RAA, Bouma BN. The contact activation mechanism in human plasma: activation induced by dextran sulfate. *Blood* 1982; 59: 1225-1233.
105. Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, Superina RA, Glynn MF, Laner B. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989; 48: 447-453.



106. Groh J, Welte M, Shahnaz CA, Anthuber M, Haller M, Kratzer MAA. Does aprotinin really reduce blood loss in orthotopic liver transplantation? *Semin Throm Hemostas* 1993; 19: 306-308.
107. Grosse H, Lobbes W, Frambach M, Ringe B, Barthels M. Influence of high-dose aprotinin on hemostasis and blood requirement in orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostasis* 1993; 19: 302-305.
108. Groth CG, Pechet L, Starzl TE. Coagulation during and after orthotopic transplantation of the human liver. *Arch Surg* 1969; 98: 31-34.
109. Gubernatis G, Pichelmayer R, Lamesch P, Grosse H, Bornscheuer A, Meyer H-J, Ringe B, Farle M, Bretschneider HJ. HTK-solution (Bretschneider) for human liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir* 1990; 375: 66-70.
110. Gzendlik C, Lammle B, Duckert F. Cold promoted activation and factor VII, prekallikrein and C1-inhibitor. *Thrombos Haemostas* 1985; 53: 242-244.
111. Haagsma EB, Gips CH, Wesenhagen H, Van Imhoff GW, Krom RAF. Liver disease and its effect on haemostasis during liver transplantation. *Liver* 1985; 5: 123-128.
112. Hajjar KA, Hajjar DP, Silverstein RL, Nackman RL. Tumor necrosis factor-mediated release of platelet-derived growth factor from cultured endothelial cells. *J Exp Med* 1987; 16: 235-245.
113. Harpel PC. Plasmin inhibitor interactions: the effectiveness of ? 2-antiplasmin inhibitor in the presence of ? 2-macroglobulin. *J Exp Med* 1977; 146: 1033-1040.
114. Harker LA. Bleeding after cardiopulmonary bypass. *N Eng J Med* 1986; 314: 1446-1448.
115. Harper PL, Luddington RJ, Jennings I, Reardon D, Seaman MJ, Carrell RW, Klinik JR, Smith M, Rolles K, Calne R. Coagulation changes following hepatic revascularisation during liver transplantation. *Transplantation* 1989; 48: 603-607.
116. Hattey E, Wojta J, Binder BR. Monoclonal antibodies against plasminogen and alpha-2-antiplas binding to native and modified antigens. : *Thromb Res* 1987; 45: 485-495.
117. Havemann K, Gramse M. Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes. In: Hörl WH, Heidland A (eds.). *Proteases: Potential role in health and disease*. New York, Plenum Publ Corp 1984; 1-13.
118. Himmelreich G, Kierzek B, Riess H. Dextran sulfate (DS) stimulated fibrinolytic activity in relation to the activity of tissue plasminogen activator (t-PA) and single and two chain urinary type plasminogen activator ((sc+tc)u-PA). *Fibrinolysis* 1990; 4: 150-152.

119. Himmelreich G, Kierzek B, Neuhaus P, Slama KJ, Jochum M, Riess H. Coagulation changes and the influence of the early perfusate in the course of orthotopic liver transplantation (OLT) when aprotinin is used intraoperatively. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1991; 2: 51-59.
120. Himmelreich G, Kierzek B, Neuhaus P, Slama KJ, Riess H. Changes of the fibrinolytic system and the influence of the early perfusate in the course of orthotopic liver transplantation (OLT) when aprotinin is used intraoperatively. *Transplant Proc* 1991, 23: 1936-1937.
121. Himmelreich G, Riess H. Inhibition of adenosine diphosphate and collagen induced platelet aggregation in vitro by the liver preservation fluid UW solution. *Transplant Proc* 1991, 23: 1939-1940.
122. Himmelreich G, Riess H. In vitro inhibition of platelet aggregation by the liver preservation fluid UW solution. *Transplantation* 1991; 52: 30-33.
123. Himmelreich G, Riess H. Die klinische Bedeutung des Fibrinolysesystems. *Dtsch med Wschr* 1991; 116: 426-430.
124. Himmelreich G, Riess H. Primäre Prophylaxe der venösen Thromboembolie. *Die Offizin* 1991; 1: 35-38.
125. Himmelreich G, Hundt K, Neuhaus P, Blumhardt G, Riess H. Decreased platelet aggregation after reperfusion in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1992; 53: 582-586.
126. Himmelreich G, Muser M, Steffen R, Bechstein WO, Slama KJ, Jochum M, Riess H. Different aprotinin applications influencing hemostatic changes in orthotopic liver transplantation (OLT). *Transplantation* 1992; 53: 132-136.
127. Himmelreich G, Bechstein WO, Riess H. Aprotinin bei Lebertransplantation. *Die gelben Hefte* 1992; 32: 166-172.
128. Himmelreich G, Kierzek B, Slama KJ, Riewald M, Neuhaus P, Riess H. Untersuchungen zur Genese der Hämostasestörungen bei orthotoper Lebertransplantation. Landbeck G, Scharrer I, Schramm W (eds.), Springer Verlag 1993; 45-48.
129. Himmelreich G, Dooijewaard G, Breinl P, Neuhaus P, Bechstein WO, Kluft C, Riess H. Role of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) in orthotopic liver transplantation. *Thromb Haemostas* 1993; 69: 56-59.
130. Himmelreich G, Hundt K, Neuhaus P, Roissant R, Riess H. Prostaglandin E1 infusion intraoperatively is reducing impaired platelet aggregation after reperfusion in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1993; 55: 819-826.

131. Himmelreich G, Müller C, Isenberg C, Bechstein WO, Roissant R, Riess H. Factor XIII activity during orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostasis* 1993; 19: 243-245.
132. Himmelreich G, Hundt K, Isenberg C, Bechstein WO, Neuhaus P, Riess H. Thrombocytopenia and platelet dysfunction in orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostas* 1993; 19: 209-212.
133. Himmelreich G, Hundt K, Bechstein WO, Rossaint R, Neuhaus P, Riess H. Influence of prostaglandin E1 infusion on hemostasis in orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostas* 1993; 19: 273-278.
134. Himmelreich G, Dooijewaard G, Breinl P, Bechstein WO, Blumhardt G, Kluft C, Riess H. Changes in urokinase-type plasminogen activator in orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostas* 1993; 19: 311-314.
135. Himmelreich G, Rosch R, Neuhaus P, Riess H. Role of Protein S in orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostas* 1993; 19: 286-289.
136. Himmelreich G, Riess H. Pathophysiologie und Therapie der Verbrauchskoagulopathie. *Klin Lab* 1993; 39: 25-30.
137. Himmelreich G, Bechstein WO, Riess H. Aprotinin in liver transplantation. *Biomedical Progress* 1993; 6: 40-43.
138. Himmelreich G, Riess H, Muser M, Kluft C, Bechstein WO, Riess H, Dooijewaard G. Increased urokinase-type plasminogen activator (u-PA) levels in graft liver perfusate and decreased single chain u-PA activation with higher levels of aprotinin. *Thromb Haemostas* 1994; 71: 12-14.
139. Himmelreich G, Riewald M, Rosch R, Blumhard G, Neuhaus P, Roissant R, Riess H. Thrombomodulin - a marker of endothelial damage during orthotopic liver transplantation. *Am J Hematol* 1994; 47: 1-5.
140. Himmelreich G, Rosch R, Neuhaus P, Riess H. Protein S in end stage liver disease and in the course of liver transplantation. *Thromb Res* 1994; 73: 269-277.
141. Himmelreich G, Jochum M, Machleidt W, Neuhaus P, Riess H. Mediators of leukocyte activation play a role in DIC during orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 354-358.
142. Himmelreich G, Jochum M, Gippner-Steppert C, Bechstein WO, Riess H. Cytokines and soluble adhesion molecules in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2000; (eingereicht).
143. van Hinsberg VWM, van den Berg EA, Fiers W, Dooijewaard G. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 1991-1998.

144. Hoffmann MW, Worigeit K, Steinhoff G, Herzbeck H, Flad H-D, Pichlmayr R. Production of cytokines (TNF-alpha, IL-1-beta) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation* 1993; 55: 329-335.
145. Howland WS, Castro EB, Fortner JB, Gould P. Hypercoagulability. Thrombelastographic monitoring during extensive hepatic surgery. *Arch Surg* 1974; 108: 605-608. 605-608.
146. Hutchinson DE, Genton E, Porter KA, Daloze PM, Huguet C, Brettschneider L, Groth CG, Starzl TE. Platelet changes following clinical and experimental hepatic homotransplantation. *Arch Surg* 1968; 97: 27-33.
147. Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 1986; 261: 3486-3489.
148. Ikeda Y, Kikuchi M, Toyama K, Watanabe K, Ando Y. Inhibition of human platelet functions by verapamil. *Thromb Haemostas* 1981; 45: 158-161.
149. Imagawa DK, Millis JM, Olthoff KM, Derus LJ, Chia D, Sugich LR, Ozawa M, Dempsey RA, Iwaki Y, Levy PJ, Terasaki PI, Busuttil RW. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. *Transplantation* 1990; 50: 219-225.
150. Ishii H, Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985; 76: 2178-2181.
151. Ishii H, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. *Blood* 1986; 67: 362-365.
152. Ishii H, Nakano M, Tsubouchi J, Ishikawa T, Uchiyama H, Hirashi S, Tahara C, Miyajima Y, Kazama M. Establishment of enzyme immunoassay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. *Thromb Haemostas* 1990; 63: 157-162.
153. Ishii H, Uchiyama H, Kazama M. Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemost* 1991; 65: 618-623.
154. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Claesson K, Moen J, Vreugdenhill PK, Wight DGD, Southard JH, Belzer FO. Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 1988; 46: 517-522.
155. Jespersen J, Kluft C. Increased euglobulin fibrinolytic potential in women on oral contraceptives low in oestrogen. Levels of extrinsic and intrinsic plasminogen activators, prekallikrein, factor XII, and C1-inactivator. *Thromb Haemostas* 1985; 54: 454-459.
156. Jespersen J. The diurnal increase in euglobulin fibrinolytic activity in women using oral contraceptives and in normal women, and the generation of intrinsic fibrinolytic activity. *Thromb Haemostas* 1986; 56: 186-188.

157. Jespersen J, Astrup T. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents: optimal conditions, reproducibility and precision. *Haemostasis* 1983; 13: 301-315.
158. Jochum M, Fritz H, Nast-Kolb D, Inthorn D. Granulozyten-Elastase als prognostischer Parameter. *Dt Arztebl* 1987; 19: 1106-1110.
159. Jochum M. Hämostasefaktoren, Zytokine, leukozytäre Proteasen und lösliche Adhäsionsmoleküle bei Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, 1999; 1(40): 44-49.
160. Jones G, Hurley JV. The effect of prostacyclin on the adhesion of leukocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol* 1984; 142: 51-59.
161. Jorg M, Binder BR. Kinetic analysis of plasminogen activator by purified plasma kallikrein. *Thromb Res* 1985; 39: 323-331.
162. Juhan-Vague I, Rijken DC, De Cock F, Mandez C, Collen D. Extrinsic plasminogen activator levels in clinical plasma samples. *Prog Fibrinolysis* 1983; 6: 65-69.
163. Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD, Belzer FO. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* 1988; 1: 617-619.
164. Kang YG, Martin DJ, Marquez J, Lewis JH, Bontempo FA, Shaw BW, Starzl TE, Winter PM. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation. *Anesth Analg* 1985; 64: 888-896.
165. Kang YG, Lewis JH, Navalgund A, Russell MW, Bontempo FA, Niren LS, Starzl TE. Epsilon-aminocaproic acid for treatment of fibrinolysis during liver transplantation. *Anesthesiology* 1987; 66: 766-773.
166. Karges HE. Blood coagulation F XIII: Determination by clot stability assays. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Third Edition, Vol V. Bergmeyer HE (ed.). Verlag Chemie, Weinheim 1984: 400-410.
167. Karmochkine M, Boffa MC, Piette JC, Cacoub P, Wechsler B, Godeau P, Juhan I, Weiller PJ. Increase in plasma thrombomodulin in lupus erythematosus with antiphospholipidantibodies (letter). *Blood* 1992; 79: 837-838.
168. Kaspar M, Ramsay MA, Nguyen AT, Cogswell M, Hurst G, Ramsay KJ. Continuous small-dose tranexamic acid reduces fibrinolysis but not transfusion requirements during orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 1997; 85: 281-285.
169. von Kaulla KN. Liver in regulation of fibrinolytic activity. *Lancet* 1964; i: 1046-1047.

170. von Kaulla KN, Kayne H, von Kaulla E, Marchioro TL, Starzl TE. Changes in blood coagulation before and after hepatectomy or transplantation in dogs and man. *Arch Surg* 1966; 92: 71-79.
171. von Kaulla KN. Clotting abnormalities in the host induced by preserved auxiliary livers. Remarks on the regulatory function of kidney and liver in coagulation and fibrinolysis. In: von Kaulla KN (ed.). *Coagulation problems in transplanted organs*. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas, 1972: 52-64.
172. Kawano T, Morimoto K, Vemura Y. Urokinase inhibitor in human placenta. *Nature (Lond.)* 1968; 217: 253-254.
173. Kenneth PM, Mentyka RA, Chambers SL, Hugli TE, Herschbach JH, Zuraw BL. Cold-dependent activation of complement: recognition, assessment, and mechanism. *J Clin Immunol* 1992; 12: 362-370.
174. Kim YJ, Kawano K, Nakashimo K, Gato S, Kobayshi M. Alleviation of 3.5-hour warm ischemic injury of the liver in pigs by cyclosporin pretherapy. *Transplantation* 1991; 51: 731-733.
175. Kratzer MA, Azad SC, Groh J, Welte M, Haller M, Pratschke E. The effects of aprotinin. Blood loss and coagulation parameters in orthotopic liver transplantation: A clinical-experimental, prospective and randomized double-blind study. *Anaesthesist* 1997; 46: 294-302.
176. Kelly DA, Tuddenham EGD. Haemostatic problems in liver disease. *Gut* 1986; 27: 339-349.
177. Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF. The effect of prostaglandin E1 on platelet function in vitro and in vivo. *Brit J Haematol* 1970; 19: 559-571.
178. Kirby RM, McMaster P, Clemens D, Hubscher SG, Angrisani L, Sealey M, Gunson BK, Salt PJ, Buckels JAC, Adams DH, Jurewicz WAJ, Jain AB, Elias E. Orthotopic liver transplantation: postoperative complications and their management. *Br J Surg* 1987; 74: 3-11.
179. Kirchheimer JC, Huber K, Polterauer P, Binder BR. Urokinase antigen in plasma of patients with liver cirrhosis and hepatoma. *Thromb Haemostas* 1985; 54: 617-618.
180. Kluft C. Levels of plasminogen activators in human plasma: new methods to study the intrinsic and extrinsic activators. In: Davidson JF, Rowen RM, Samama MM, Desnoyers PC (eds.). *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, Vol.3, New York: Raven Press 1978: 141-164.
181. Kluft C, Trumpi-Kalshoven MM, Jie AFH, Veldhuyzen-Stolk EC. Factor XII-dependent fibrinolysis: a double function of plasma kallikrein and the occurrence of a previously undescribed factor XII- and kallikrein-dependent plasminogen proactivator. *Throm Haemostas* 1979; 41: 756-773.

182. Kluft C, Trumpi-Kalshoven MM, Jie AFH. Determination of prekallikrein levels in plasma with chromogenic substrates. In: Scully MF, Kakkar VV (eds.). *Chromogenic Peptide Substrates: Chemistry and Clinical Usage*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1979; 84-92.
183. Kluft C. Plasminogen proactivators and activators in human plasma: F XII-dependent fibrinolysis. In Peters H (ed.). *Protides of biological fluids*. Pergamon Press, Brussels, 1980: 375-378.
184. Kluft C, Wijngaard G, Jie AFH. The factor XII-independent plasminogen proactivator system of plasma includes urokinase-related activity. *Thromb Haemost* 1981; 46: 343-349.
185. Kluft C, Los P, Svendsen L. Blood coagulation factor XII: Hageman factor. In Bergmeyer HV, Bergmeyer J, Grabl M (eds.). *Methods of enzymatic analysis, Enzymes 3: Peptidases, proteinases and their inhibitors*. Verlag Chemie, Weinheim 1984; 5: 394-399.
186. Kluft C, Wijngaards G, Jie AFH. Intrinsic plasma fibrinolysis: involvement of urokinase-related activity in the factor XII-independent plasminogen proactivator pathway. *J Lab Clin Med* 1984; 103: 408-419.
187. Kluft C, Doojiewaard G, Emeis JJ. Contact product formation: balanced activation of coagulation and fibrinolysis. In: Schmid-Schonbein H, Wurzinger LJ, Zimmermann RE (eds.). *Enzyme Activation in Blood Perfused Artificial Organs*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston/Dordrecht 1985: 9-31.
188. Kluft C, Doojiewaard G, Emeis JJ. Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemostas* 1987; 13: 50-68.
189. Kluft C. Pathomechanisms of defective hemostasis during and after extracorporeal circulation: contact phase activation. In: Blood use in cardiac surgery. Friedel N, Hetzer R, Royston D (eds.). Heidelberg: Steinkopff Verlag 1991: 10-15.
190. Knot EAR, Drijfhout HR, ten Cate JW, de Jong E, Iburg AHC, Kahlé LH, Grijm R. ? 2-plasmin inhibitor metabolism in patients with liver cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1985; 105: 353-361.
191. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M, Günzler WA, Janicke F, Graeff H. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-u-PA). *J Biol Chem* 1991; 266: 5147-5152.
192. Kodama S, Uchijima E, Nagai M, Mikawatani K, Hayashi T, Suzuki K. One-step sandwich enzyme immunoassay for soluble thrombomodulin using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1990; 192: 191-199.
193. Kok P, Nilsson T. Assay characteristics and fibrin affinity of plasminogen activators of the intrinsic fibrinolytic system. *Thromb Res* 1986; 41: 197-209.

194. Kraut H, Frey ER, Werle E. Über die Inaktivierung des Kallikreins. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1930; 192: 1-21.
195. Kruithof EKO, Tran-Thang C, Ransijn A, Bachmann F. Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma. Blood 1984; 64: 907-913.
196. Kruithof EKO, Tran-Thang C, Bachmann F. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets. Thromb Haemostas 1986; 55: 201-205.
197. Kruithof EKO, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliono RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell U-937. J Biol Chem 1986; 261: 11207-11213.
198. Kunitz M, Northrop JH. Isolation from beaf pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor, and an inhibitor trypsin compound. J Gem Physiol 1936; 19: 991-1007.
199. Lang H, Fritz H. The role of phagocyte proteinases in the pathobiochemistry of inflammation. In: Advances in Clinical Enzymology. Moss DW, Schmidt E, Schmidt FW (eds.), Karger, Basel, 1986; Vol 3: 168-176.
200. Lang H, Dreher M, Heubner H. Diagnostische Validität der Plasma-Elastase als prädiktiver, biochemischer Marker für infektiöse beziehungsweise entzündliche Komplikationen. Dt Ges f Klin Chemie e.V., Mitteilungen 1, 1989: 10-16.
201. Lang H, Jochum M, Fritz H, Redl H. Validity of the elastase assay in intensive care medicine. In: Schlag G, Redl H (eds.). Second Vienna Shock Forum. Progress in Clinical and Biological Research, Alan R.Liss, Inc. New York; 1989; Vol.308: 701-710.
202. Langley PG, Hughes RD, Williams R. Platelets adhesiveness to glass beads in liver cirrhosis. Acta haemat 1982; 67: 124-127.
203. Larsson LI, Shriver L, Nielsen LS, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Dano K. Distribution of urokinase-type plasminogen activator immunoreactivity in the mouse. J Biol Chem 1984; 98: 894-903.
204. Lechner K, Fritsch A, Mach K, Beneckendorff P, Reich N, Kux M, Boehmig HJ. Intravascular coagulation in orthotopic transplantation of the canine liver. In: von Kaulla KN (ed.). Coagulation problems in transplanted organs. Springfield, III., Charles C. Thomas, 1972: 5-15.
205. Levy LR, Lepow IH. Assay and properties of serum inhibitor of C1-esterase. Proc Soc Exp Biol Med 1959; 101: 608-611.
206. Lewis JH, Doyle AP. Effects on epsilon amino caproic acid on coagulation and fibrinolytic mechanisms. J Am Med Ass 1964; 188: 56-63.



207. Lewis JH, Bontempo FA, Kang YG, Spero JA, Ragni MV, Starzl TE. Intraoperative coagulation changes in liver transplantation. In: Winter PM, Kang YG (eds.). Hepatic transplantation. Praeger, New York, 1986: 142-150.
208. Lewis JH, Bontempo FA, Cornela FW, Kiss JE, Larson P, Ragni MV, Rice EO, Spero JA, Starzl TE. Blood use in liver transplantation. Transfusion 1987; 27: 222-225.
209. Lewis JH, Bontempo FA, Kang YG, Kiss JE, Ragni MV, Spero JA, Starzl TE. Liver transplantation: intraoperative changes in coagulation factors in 100 first transplants. Hepatology 1989; 9: 710-714.
210. Lie TS, Seger R, Hong GS, Preissinger H, Ogawa K. Protective effect of aprotinin on ischemic hepatocellular damage. Transplantation 1989; 48: 396-399.
211. Lijnen HR, Zamarron C, Blaber M, Winkler ME, Collen D. Activation of plasminogen by pro-urokinase. J Biol Chem 1986; 261: 1253-1258.
212. Llamas P, Cabrera R, Gomez-Arnau J, Fernandez MN. Hemostasis and blood requirements in orthotopic liver transplantation with and without high-dose aprotinin. Haematologica 1998; 83: 338-346.
213. Lohse W, Winkler H, Wolff H. Zur Bedeutung des Antithrombin III bei der klinischen Lebertransplantation. Zentralbl Chir 1985; 110: 803-810.
214. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJM. Human factor XIII: Fibrin-stabilizing factor. Prog Haemost Thromb 1980; 5: 245-251.
215. Loskutoff DJ, Mussoni L. Interaction between fibrin and the plasminogen activator produced by cultured endothelial cells. Blood 1983; 62: 62-68.
216. Lu H, Soria C, Cramer EM, Soria J, Maclof J, Perrot JJ, Li H, Commin PL, Schumann F, Regnier O, Lijnen RH, Caen JP. Temperature dependence of plasmin-induced activation or inhibition of human platelets. Blood 1991; 77: 996-1005.
217. Luscinskas FN, Cybursky MI, Keily JM, Perkins CS, Davis VM, Gimbrone Jr MA. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion- and intercellular adhesion molecule-1. J Immunol 1991; 146: 1617-1625.
218. Machovich R, Himer A, Owen WG. Neutrophil proteases in plasminogen activation. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1990; 1: 273-277.
219. Machovich R, Owen WG. An elastase-dependent pathway of plasminogen activation. Biochemistry 1989; 28: 4517-4522.

220. Maddrey WC, van Thiel DH. Liver transplantation: an overview. *Hepatology* 1988; 8: 948-959.
221. Mallett SV, Cox D, Burroughs AK, Rolles K. The intraoperative use of trasylol (aprotinin) in liver transplantation. *Transplant Int* 1991; 4: 227-230.
222. Mahmoud M, Gaffney PJ. Bioimmunoassay (BIA) of tissue plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (t-PA/INH). *Thromb Haemostas* 1985; 53: 356-359.
223. Mannucci PM, Forman SP. Hemostasis and thrombosis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ (eds.). *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincott, 1982: 595-601.
224. Marcel RJ, Stegall WC, Suit CT, Arnold JC, Vera RL, Ramsay MA, O'Donnell MB, Swygert TH, Hein HA, Whitten CW. Continuous small-dose aprotinin controls fibrinolysis during orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 1996; 82: 1122-1125.
225. Martinez J, Palascak JE. Hemostatic alterations in liver disease. In: Zakim D, Boyer JA (eds.). *Hepatology*. Phil Saunders 1982: 546-582.
226. Martinez J, Iglewicz B. A test for departure from normality based on biweight estimator of scale. *Biometrika* 1981; 68: 331-335.
227. Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 1985; 101: 363-371.
228. Mathews KP, Mentyka RA, Chambers SL, Hugli TE, Herschbach JH, Zuraw BL. Cold-dependent activation of complement: recognition, assessment, and mechanism. *J Clin Immunol* 1992; 12: 362-370.
229. McDonagh J. Structure and function of factor XIII in hemostasis and thrombosis. In: RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman (eds.). *Hemostasis and thrombosis*. Lippincott, Philadelphia, 1987: 289-300.
230. Miles LA, Greengard JS, Griffin JH. A comparison of the abilities of plasma kallikrein,  $\beta$ -factor XIIa, factor XIa and urokinase to activate plasminogen. *Thromb Res* 1983; 29: 407-414.
231. Monden H, Fortner JG. Twenty-four and 48-hour canine liver preservation by simple hypothermia with prostacyclin. *Ann Surg* 1982; 196: 38-42.
232. Morgan GR, Harvey PRC, Strasberg SM. Aprotinin for the pretreatment of liver allograft donors (letter) *Transplantation* 1990; 49: 1203.

233. Moriau M, Kestens PJ, Masure R. Heparin and antifibrinolytic agents during experimental hepatectomy and liver transplantation. *Pathol Eur* 1969; 4: 172-182.
234. Moriau M, Kestens PJ, Otte JB, Masure R. Hemostatic changes during hepatectomy, orthotopic liver transplantation, and graft rejection: an experimental and clinical study. In: von Kaulla KN (ed.). *Coagulation problems in transplanted organs*. Springfield, III: Charles C, Thomas, 1972: 16-23.
235. Morishita E, Saito M, Asakura H, Jokaji H, Uotani C, Kumabashiri I, Yamazaki M, Matsuda T. Increased levels of plasma thrombomodulin in chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol* 1992; 39: 183-187.
236. Moroi M, Aoki N. Isolation and characterization of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor from human plasma. *J Biol Chem* 1976; 251: 5956-5965.
237. Motschman TL, Tawell HF, Brecher ME, Rakelo J, Grambsch PM, Larson-Keller JJ, Rettke SR, Krom RAF. Intraoperative blood loss and patient and graft survival in orthotopic liver transplantation: their relationship to clinical and laboratory data. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 346-355.
238. Motschman TL, Taswell HF, Brecher ME, Rettke SR, Weisner RH, Krom RAF. Blood bank support of liver transplantation program. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 103-111.
239. von Müller C, Fleischer J, Renger F, Wolff H. Das Gerinnungssystem bei Leberkrankheiten unter besonderer Berücksichtigung der Lebertransplantation. *Z Gesamte Inn Med* 1981; 36: 660-665.
240. Müller-Berghaus G, Reuter C, Bleyl U. Experimental galactosamine-induced hepatitis. *Am J Pathol* 1976; 82: 393-404.
241. Müller-Berghaus G, Preissner KT. Regulation der Thrombinaktivität an der Interphase zwischen Blut und Gefäßwand, Interaktion der Komponenten Protein C, Protein S und Thrombomodulin. *Hämostaseologie* 1987; 7: 14-23.
242. Müller-Esterl W, Oetl A, Truscheit E, Fritz H. Monitoring of aprotinin plasma levels by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fresenius Z Anal Chem* 1984; 317: 718.
243. Müllertz S, Clemmensen I. The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem J* 1976; 159: 545-553.
244. Mulvin D, Jones K, Howard R, Grosso M, Repine J. The effect of prostacyclin as a constituent of a preservation solution in protecting lungs from ischemic injury because of its vasodilatory properties. *Transplantation* 1990; 49: 828-830.

245. Munkvad S, Jespersen J, Gram J, Kluft C. Long-lasting depression of the factor XII-dependent fibrinolytic system in patients with myocardial infarction undergoing thrombolytic therapy with recombinant tissue-type plasminogen activator: a randomized placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 957-962.
246. Munkvad S, Jespersen J, Gram J, Kluft C. Depression of factor XII-dependent fibrinolytic activity characterizes patients with early myocardial reinfarction after recombinant tissue-type plasminogen activator therapy. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 454-458.
247. National Institutes of Health consensus development conference statement: liver transplantation. *Hepatology* 1984; 4: 1078-1108.
248. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial-cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163: 740-745.
249. Neuhaus P, Bechstein WO, Hopf U, Blumhardt G, Steffen R. Indikationen und aktuelle Entwicklung der Lebertransplantation. *Leber Magen Darm* 1989; 19: 289-308.
250. Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Steffen R, Keck H. Side-to-side anastomosis of the common bile duct is the method of choice for biliary tract reconstruction after liver transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 1571.
251. Neuhaus P, Bechstein WO, Lefèbre B, Blumhardt G, Slama K. Effect of aprotinin on intraoperative bleeding and fibrinolysis in liver transplantation. *Lancet* 1988; II: 1924.
252. Neumann S, Gunzer G, Hennrich N, Lang H. PMN elastase assay: Enzyme immunoassay for human polymorphonuclear elastase complexed with alpha1-proteinase inhibitor. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 693-697.
253. Nichol CA, Smith GK, Duch DS. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdoperin. *Ann Rev Biochem* 1985; 54: 729-764.
254. Nicolini FA, Wilson AC, Mento P, Mehto JL. Comparative platelet inhibitory effects of human neutrophils and lymphocytes. *J Lab Clin* 1990; 116: 147-152.
255. Nilsson IM, Sjoerdsma A, Waldenstrom J. Antifibrinolytic activity and metabolism of epsilon amino caproic acid in man. *Lancet* 1960; i: 1322-1326.
256. O'Connell RA, Grossi CE, Rousselot LM. Role of inhibitors of fibrinolysis in hepatic cirrhosis. *Lancet* 1964; ii: 990-991.
257. Oehler G, Bleyl H, Bischoff B, Henk R. Vergleich von Prothrombin-Aktivität und -Konzentration bei verschiedenen Funktionszuständen der Leber. *Verh dtsch Ges inn Med* 1974; 80: 1452-1456.

258. Ohno N, Ichikawa H, Coe L, Kvietys PR, Grander DN, Alexander JS. Soluble selectins and ICAM-1 modulate neutrophil-endothelial adhesion and diapedesis in vitro. *Inflammation* 1997; 21: 313-324.
259. Olthoff KM, Millis JM, Imagawa DK, Nuesse BJ, Derus LJ, Rosenthal JT, Milewicz AL, Busuttil RW. Comparison of UW solution and Euro-Collins solutions for cold preservation of human liver grafts. *Transplantation* 1990; 49: 284-290.
260. Ossanna PJ, Test ST, Matheson NR, Regiani S, Weiss SJ. Oxidative regulation of neutrophil elastase - ? 1-proteinase inhibitor interactions. *J Clin Invest* 1986; 77: 1939-1951.
261. Otto G, Wolff H, Uerlings I, Gellert K. Preservation damage in liver transplantation. Influence of rapid cooling. *Transplantation* 1986; 42: 122-124.
262. Owen CA, Rettke SR, Bowie EJW, Cole TL, Jensen CC, Wiesner RH, Krom RAF. Hemostatic evaluation of patients undergoing liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 761-772.
263. Palareti G, De Rosa V, Fortunato G, Grauso F, Legnani C, Maccaferri M, Poggi M, Bianchini B, Bellusci R, Franceschelli N, Coccheri S. Control of hemostasis during orthotopic liver transplantation. *Fibrinolysis* 1988; 2, suppl 3: 61-66.
264. Patrassi GM, Viero M, Sartori MT, De Silvestro G, Rossaro L, Burra P, Nolli ML, Piccinni P, Bassi N. Aprotinin efficacy on intraoperative bleeding and transfusion requirements in orthotopic liver transplantation. *Transfusion* 1994; 34: 507-511.
265. Pechet L, Groth CG, Daloze PM. Changes in coagulation and fibrinolysis after orthotopic canine liver homotransplantation. *J Lab Clin Med* 1968; 73: 91-102.
266. Perkins HA, May RE, Belzer FO. Cause of abnormal bleeding after transplantation of pig liver stored by a perfusion technique. *Arch Surg* 1970; 101: 62-68.
267. Plevak DF, Halma GA, Forstrom LA, Dewanjee MK, O'Connor MK, Moore SB, Krom RAF, Rettke SR. Thrombocytopenia after liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; XX,suppl 1 630-633
268. Pober JS, Gimbrone MA, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *n J Immunol* 1986; 137: 1893-1896.
269. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990; 50: 537-544.
270. Poller L. Coagulation abnormalities in liver disease. In: Poller L (ed.). *Recent advances in blood coagulation*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977: 267-292.

271. van der Poll T, van Deventer SJH, Hack CE, Wolbink GJ, Aarden LA, Büller HR, ten Cate JW. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy humans. *Blood* 1992; 79: 693-698.
272. Popov S, Kalinkel H, Etzel F, Bayman E, Egli H. Coagulation changes during and after liver transplantation in man. In: von Kaulla KN (ed.). *Coagulation problems in transplanted organs*. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas, 1972: 31-51.
273. Porte RJ, Blauw E, Knot EAR, de Maat MPM, de Ruitter C, Terpstra OT. Role of the donor liver in the origin of thrombocytopenia and hemostatic disorder in porcine liver transplantation. In: Porte RJ: *Hemostatic disorders in orthotopic and auxiliary liver transplantation. Clinical and experimental studies (thesis)*. Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands 1989: 37-54.
274. Porte RJ, Knot EAR, Bontempo FA. Hemostasis in liver transplantation: a review *gastroenterology* 1989; 97: 488-501.
275. Porte RJ, Bontempo FA, Knot EAR, Lewis JH, Kang YG, Starzl TE. Systemic effects of tissue plasminogen activator associated fibrinolysis and its relation to thrombin generation in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 978-985.
276. Porte RJ, Molenaar IQ, Begliomini B, Groenland TH, Januszkiewicz A, Lindgren L, Palareti G, Hermans J, Terpstra OT. Aprotinin and transfusion requirements in orthotopic liver transplantation: a multicenter randomised double-blind study EMSALT Study Group. *Lancet* 2000; 355: 1303-1309.
277. Powers JC, Harper JW. Serine protease inhibitors. In: Barrett AJ, Salveson G (eds.). *Proteinase inhibitors*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam 1986: 55-152.
278. Rake MO, Flute PT, Pannell G, Shilkin KB, Williams R. Experimental hepatic necrosis: studies on coagulation abnormalities, plasma clearance, and organ distribution of <sup>125</sup>I-labelled fibrinogen. *Gut* 1973; 14: 574-580.
279. Ratnoff OD. Disordered haemostasis in hepatic disease. In: Schiff L, Schiff ER (eds.). *Disease of the liver*. New York: Lippincott, 1987: 187-207.
280. Reganon E, Vila V, Aznar J, Garrido G, Estelles A, Berenguer J. Study of the formation of fibrin clot in cirrhotic patients. An approach to study of acquired dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 1987; 46: 705-714.
281. Richards EM, Alexander GJ, Calne RY, Baglin TP. Thrombocytopenia following liver transplantation is associated with platelet consumption and thrombin generation. *Br J Haematol* 1997; 98: 315-321.

282. Riess H, Jochum M, Machleidt W, Himmelreich G, Slama KJ, Steffen R. Possible role of the phagocytic proteinases cathepsin B and elastase in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 1947-1948.
283. Riess H, Jochum M, Machleidt W, Himmelreich G, Blumhardt G, Roissant R, Neuhaus P. Possible role of extracellularly released phagocyte proteinases in the coagulation disorder during liver transplantation. *Transplantation* 1991, 52: 482-490.
284. Riess H, Jochum M, Machleidt W, Himmelreich G, Bechstein WO, Muser M, Neuhaus P, Roissant R, Huhn D. Role of leukocytes in hemostasis during orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemostas* 1993; 19: 197-208.
285. Riess H, Himmelreich G, Jochum M, Machleidt W, Hundt K, Neuhaus P, Huhn D. Hemostasis in orthotopic liver transplantation - a model for studying DIC development? In: *DIC - pathogenesis, diagnosis and therapy of disseminated intravascular fibrin formation*. G Müller-Berghaus, K Madleiner, M Blombäck, JW ten Cate (eds.). Excerpta Medica Amsterdam 1993: 71-81.
286. Rijken DC, Binnema DJ, Los P. Specific fibrinolytic properties of different molecular forms of pro-urokinase from a monkey kidney culture. *Thromb Res* 1986; 42: 761-768.
287. Rö JS. Hemostatic problems in liver surgery. *Scand J Gastroenterol* 1973; 8(Suppl 1): 71-81.
288. Roberts HR, Cederbaum AI. The liver and blood coagulation: physiology and pathology. *Gastroenterology* 1972; 63: 297-320.
289. Royston D, Bidstrup BP, Taylor IZM, Sapsford RN. Effect of aprotinin on need for blood transfusion after repeat open heart surgery. *Lancet* 1987; ii: 1289-1291.
290. Salat A, Mueller MR, Boehm D, Stangl P, Pulaki S, Laengle F. Influence of UW solution on in vitro platelet aggregability. *Transpl Int* 1996; 9: S429-S431.
291. Sato M, Nashan B, Ringe B, Grosse H, Barthels M, Pichelmayer R. Coagulation disorders during liver transplantation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1991; 2: 25-31.
292. Schapiro M, de Agostini A, Colman RW. C1-inhibitor: The predominant inhibitor of plasma kallikrein. *Meth Enzymol* 1988; 163: 179-185.
293. Schiller JH, Witt PL, Storer B, Alberti D, Tombes MB, Arzoomanum R, Brown RR, Dractor RA, Voss SD, Springs DR, Trump DL, Borden EC. Clinical and biologic effects of combination therapy with gamma-interferon and tumor necrosis factor. *Cancer* 1992; 69: 562-571.
294. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma Injury Infec Crit Care* 1998; 44: 874-882.

295. Scudamore CH, Randall TE, Jewesson PJ, Shackleton CR, Salvian AJ, Fagan M, Frighetto L, Grove GH, Scarth I, Erb SR. Aprotinin reduces the need for blood products during liver transplantation. *Am J Surg* 1995; 169: 546-549.
296. Segal HC, Hunt BJ, Cottam S, Beard C, Francis JL, Potter D, Tan KC. Changes in the contact system during orthotopic liver transplantation with and without aprotinin. *Transplantation* 1995; 59: 366-370.
297. Segal H, Cottam S, Potter D, Hunt BJ. Coagulation and fibrinolysis in primary biliary cirrhosis compared with other liver disease and during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25: 683-688.
298. Shattil SJ, Bennett JS, McDonough M, Turnbull J. Carbenicillin and Penicillin G inhibit platelet function in vitro by impairing the interaction of agonists with the platelet surface. *J Clin Invest* 1980; 65: 329-337.
299. Shaw BW, Martin DJ, Marquez JM, Kang YG, Bugbee AC, Iwatsuki S, Griffith BP, Hardesty RL, Bahnson HT, Starzl TE. Venous bypass in clinical liver transplantation. *Ann Surg* 1984; 200: 524-534.
300. Silverman P, Goldsmith GH, Spitzer TR, Rehms EH, Berger NA. Effect of tumor necrosis factor on the human fibrinolytic system. *J Clin Oncology* 1990; 8: 468-475.
301. Sinclair SB, Greig PD, Blendis LM, Woolf GM, Abecassis M, Strassberg SM, Levy GA. Biochemical and clinical response of fulminant viral hepatitis to administration of prostaglandin E1. A preliminary report. *J Clin Invest* 1989; 84: 1063-1069.
302. Sinzinger H, Virgolini I, Fitscha P, Rauscha F, Kaliman J. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulating endothelial cells - one mechanism underlying the clinical action of PGE1? *Br J Clin Pharmacol* 1988; 25: 775-776.
303. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and MAL-1 with intercellular adhesion molecule-1 infacilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989; 83: 2008-2017.
304. Smith O, Hazlehurst G, Brozovic B, Rolles K, Burroughs A, Mallett S, Dawson K, Mehta A. Impact of aprotinin on blood transfusion requirements in liver transplantation. *Transfus Med* 1993; 3: 97-102.
305. Spaet TH, Horowitz HI, Franklin DZ, Cintron J, Biezensi JJ. Reticuloendothelial clearance of blood thromboplastin in rats. *Blood* 1961; 17: 196-205.
306. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 381-387.



307. Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Herrman G. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obst* 1963; 117: 659-676.
308. Starzl TE, Iwatsuki S, van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Schade RR, Shaw BW, Hakala TR, Rosenthal HJT, Porter KA. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982; 2: 614-636.
309. Starzl TE, Demetris AJ, van Thiel DH. Liver transplantation. *N Engl J Med* 1984; 311: 1658-1664.
310. Starzl TE, Demetris AJ, van Thiel DH. Liver transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* 1989; 321: 1014-1022.
311. Stein SF, Harker LA. Kinetic and functional studies of platelets, fibrinogen, and plasminogen in patients with hepatic cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1982; 99: 217-230.
312. Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P. Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol* 1986; 102: 1971-1978.
313. Stremple JF, Hussey CV, Ellison EH. Study of clotting factors in liver transplantation. *Am J Surg* 1966; 111: 862-869.
314. Sumimoto R, Jamieson NV, Wake K, Kamada N. 24-hour rat liver preservation using UW solution and simplified variants. *Transplantation* 1989; 48: 1-5.
315. Stump DC, Lijnen HR, Collen D. Purification and characterization of single-chain urokinase type activator from human cell cultures. *J Biol Chem* 1986; 261: 1274-1278.
316. Suzuki K, Nichioka J, Hayaoni T, Kosaka Y. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J Biochem* 1988; 104: 628-632.
317. Takahashi H, Hanano M, Wada K, Tatewaki W, Niwano H, Tsubouchi J, Nakano M, Nakamura T, Shibata A. Circulating thrombomodulin in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1991; 38: 174-177.
318. Takahashi H, Ito S, Hanano M, Wada K, Niwano H, Seki Y, Shibata A. Circulating thrombomodulin as a novel endothelial cell marker: comparison of its behavior with von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator. *Am J Hematol* 1992; 41: 32-39.
319. Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood* 1990; 76: 2024-2029.
320. Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51: 959-965.

321. Tanaka A, Ishii H, Hiraishi S, Kazama M, Maezawa H. Increased thrombomodulin values in plasma of diabetic men with microangiopathy. *Clin Chem* 1991; 37: 269-272.
322. Tankersley DL, Finlayson JS. Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry* 1984; 23: 273-279.
323. Tate KM, Higgins DL, Holmes WE, Winkler ME, Heyneker HL, Vehar GH. Functional role of proteolytic cleavage at arginine - 275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis. *J Biochem* 1987; 26: 338-343.
324. Taylor KM. Aprotinin therapy in cardiac surgery. *Therapy Express* 1991; 37: 1-5.
325. Thorsen S. Difference in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation. Influence of aminocarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta* 1975; 393: 55-65.
326. van Thiel DH, Tarter R, Gavaler JS, Potanka WM, Schade RR. Liver transplantation in adults. An analysis of cost and benefits at the University of Pittsburgh. *Gastroenterology* 1986; 90: 211-216.
327. Tilsner V. Aktivierung der endogenen Fibrinolyse durch Prostaglandin E1. In: Heidrich H, Böhme H, Rogatti W (eds.). *Prostaglandin E1 Wirkungen und therapeutische Wirksamkeit*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1988: 76-79.
328. Todo S, Tzakis A, Starzl TE. Preservation of livers with UW or Euro-Collins solution. *Transplantation* 1988; 46: 925-926.
329. Todo S, Nery J, Katsuhiko Y, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 1989; 261: 711-714.
330. Toghill PJ, Green S, Ferguson R. Platelet dynamics in chronic liver disease with special reference to the role of the spleen. *J Clin Pathol* 1977; 30: 367-371.
331. Tranquille N, Emeis JJ. Release of tissue-type plasminogen activator is induced in rats by leukotrienes C4 and D4, but not by prostaglandins E1, E2 and I2. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 156-164.
332. Troppmair J, Nachbaur K, Herold M, Aulitzky W, Tilg H, Gastl G, Bieling P, Kotlan B, Flener R, Mull B, Aulitzky WO, Rokos H, Huber C. In-vitro and in-vivo studies on the induction of neopterin biosynthesis by cytokines, alloantigens and lipopolysaccharide (LPS). *Clin Exp Immunol* 1988; 74: 392-397.
333. Thurman RG, Marzi I, Seitz J, Lemasters JJ, Zimmermann FA. Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1988; 46: 502-506.

334. Tygat GN, Collen D, Verstraete M. Metabolism of fibrinogen in cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 1971; 50: 1690-1701.
335. Vaughan DE, Plavin SR, Schafer AI, Loscalzo J. PGE1 accelerates thrombolysis by tissue plasminogen activator. *Blood* 1989; 73: 1213-1217.
336. Verheijen JH, Mullaart E, Chang GTG, Kluft C, Wijngaards G. A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thromb Haemostas* 1982; 48: 266-269.
337. Verheijen JH, Chang GTG, Kluft C. Evidence for the occurrence of a fast acting inhibitor of tissue type plasminogen activator in human plasma. *Thromb Haemostas* 1984; 51: 392-395.
338. Verstraete M, Vermeylen J, Collen D. Intravascular coagulation in liver disease. *Ann Rev Med* 1974; 25: 447-455.
339. Verstraete M. Clinical applications of inhibitors of fibrinolysis. *Drugs* 1985; 29: 236-261.
340. Verstraete M, Su CAPF, Transwell P, Feuerer W, Collen D. Pharmacokinetics and effects on fibrinolytic and coagulation parameters of two doses of recombinant tissue-type plasminogen activator in healthy volunteers. *Thromb Haemostas* 1986; 56: 1-5.
341. Wachtfogel YT, Harpel PC, Edmunds LH, Colman RW. Formation of C1s-C1-inhibitor, kallikrein-C1-inhibitor, and plasmin-? 2-plasmin inhibitor complexes during cardiopulmonary bypass. *Blood* 1991; 73: 468-471.
343. Wada H, Ohiwa M, Kaneko T, Tamaki S, Tanigawa M, Shirakawa S, Koyama M, Hayashi T, Suzuki K. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular disorders in thrombotic-thrombocytopenic purpura and disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1992; 39: 20-24.
344. Wahlberg J, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology* 1986; 23: 477-482.
345. Walsh PN. The role of platelets in the contact phase of blood coagulation. *Brit J Haemat* 1972; 22: 237-254.
346. Walsh PN. The effects of collagen and kaolin in the intrinsic coagulant activity of platelets. Evidence for an alternative pathway in intrinsic coagulation not requiring factor XII. *Brit J Haemat* 1972; 22: 393-405.
347. Wanaka K, Okamoto S, Bohgaki M, Hijikata-Okunomiya A, Naito T, Okada Y. Effect of a highly selective plasma-kallikrein synthetic inhibitor on contact activation relating to kinin generation, coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res* 1990; 57: 889-895.

348. Wasantapruek S, Homates J, von Kaulla KN, Eisenmann B. Clotting abnormalities including intravascular coagulation following transplantation of preserved livers in pigs. *Thromb Diath Haemorrh* 1969; 36(Suppl): 319-332.
349. Weiner M, de Crinis K, Redisch W, Steele JM. Influence of some vasoactive drugs on fibrinolytic activity. *Circulation* 1959; 19: 845-848.
350. Weksler BB, Ley CW, Jaffe EA. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin and the ionophore A 23187. *J Clin Invest* 1978; 62: 923-930.
351. Wenger RK, Lukasiewicz H, Mikuta BS, Niewkarowski S, Edmunds LH. Loss of platelet fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 97: 235-239.
352. Westaby S. Aprotinin in perspective. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 1033-1041.
353. Westlin WF, Gimbrone MA. Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation. *Am J Pathol* 1993; 142: 117-128.
354. Wijngaards G, Kluft C, Groeneveld E. Demonstration of urokinase-related fibrinolytic activity in human plasma. *Br J Haematol* 1982; 51: 165-169.
355. Wildevuur CRH, Eijssman L, Roozendaal KJ, Harder MP, Chang M, van Oeven W. Platelet preservation during cardiopulmonary bypass with aprotinin. *Eur J Cardiothorac Surg* 1989; 3: 533-538.
356. Wiman B, Collen D. On the mechanism of the reaction between human  $\alpha_2$ -antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem* 1979; 254: 9291-9297.
357. Wolpl A, Lattke H, Board PG, Arnold R, Schmeiser T, Kubanek B, Robin-Winn M, Pichelmayer R, Goldmann SF. Coagulation factor XIII A and B subunits in bone marrow and liver transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 151-153.
358. Wurzel HA. Incidence of various coagulation defects and their association with different diseases. *Am J Med Sci* 1961; 241: 625-631.
359. Zurborn K-H, Gram J, Rohwedder E, Bewig B, Bruhn HD. Der Einfluss der Leberzirrhose auf die Aktivierung des Gerinnungs- und Fibrinolyse systems und auf die Gerinnungsinhibitoren. *Med Klin* 1989; 84: 515-518.
360. Zurborn K-H, Kirch W, Bruhn HD. Immunological and functional determination of the protease inhibitors, protein C and antithrombin III in liver cirrhosis and in neoplasia. *Thrombos Res* 1988; 52: 325-336.

## Lebenslauf

<b>Familienstand:</b>	verheiratet, 5 Kinder
16.Oktober 1961	in Hannover als erstes Kind des Christoph-Rüdiger Freiherrn von Forstner und seiner Frau Mechtild geb. v. Arnswaldt geboren.
Mai 1981	Abitur am Nelly-Sachs Gymnasium in Neuss.
<b>Universitätsausbildung:</b>	
Oktober 1981 - November 1987	Studium der Medizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Uni- versität Bonn mit Famulaturen am American Hospital of Paris (Innere Medizin), am Hôpital Cochin, Paris (Innere Medizin), am University College Hospital, London (Kinderheilkunde, Gynäkologie) und am Royal Free Hospital, London (Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie).
August 1986	2.Staatsexamen
Oktober 1986 – Oktober 1987	Praktisches Jahr am Universitätsspital Zürich (Chirurgie), am Triemlispital Zürich, (Innere Medizin) und am Hôpital Necker - enfants malades, Paris (Kinderheilkunde).
November 1987	3.Staatsexamen.
Januar 1989	Promotion zum Doktor der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn mit dem Thema: „Zum Einfluß der hereditären Hypertoniebelastung auf die Blutdruckreaktion im ambulanten Streßtest“ bei Prof.W.Schulte.
<b>Beruflicher Werdegang:</b>	
März - Juni 1988	HNO-Abteilung (Prof.v.Scheel) des Universitätsklinikums Rudolf Virchow.
Seit Juli 1988	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung der Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Rudolf Virchow (Prof. Huhn).
November 1990 – Oktober 1991 und Oktober 1992 – Februar 1993	Forschungsaufenthalte am Gaubius Institut (Dr.Cornelius Kluft), Leiden, Niederlande.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt vor allem und ganz besonders meinem Oberarzt und Mentor Professor Dr. H. Riess, der meinen wissenschaftlichen Werdegang von Beginn an mit sachverständiger Kritik, nicht nachlassender Ermutigung und großer Anteilnahme begleitet hat.

Herzlich möchte ich Christa Isenberg-Langemann, Rosemarie Rosch, Karoline Hundt, Beate Kierzek, Dr.Martin Muser und Peter Breinl danken, die mir als MTA bzw. als von mir betreute Doktoranden wertvolle Hilfe geleistet haben.

Besonderer Dank gilt auch Dr.Cornelius Kluft und Dr.Gerard Dooijewaard vom Gaubius Institut, Leiden, Niederlande, die in zahlreichen gemeinsamen Diskussionen viele Anregungen gaben.

Herrn Professor Dr.D.Huhn danke ich sehr für seine fördernde Begleitung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit parallel zu meiner klinischen Arbeit in seiner Abteilung.

Dankbar bin ich natürlich auch meinem Mann, der meine wissenschaftliche Tätigkeit mit viel Verständnis unterstützte.